

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. R. Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

ANTI-INFLAMMATORISCHE WIRKUNG
VON ALDOSTERON AUF MIKROGLIA
VOR DEM HINTERGRUND
NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Björn-Ole Bast

aus Kiel

Kiel, 08.03.2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius,
Anatomisches Institut

2. Berichterstatter: PD Dr. Friederike Egberts,
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2019

Zum Druck genehmigt; Kiel, den 15.11.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

*Meinen Eltern
und Großeltern*

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis.....	V
III. Abbildungsverzeichnis.....	VII
IV. Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen.....	1
1.1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.2 Morbus Alzheimer.....	2
1.1.3 Morbus Parkinson.....	2
1.2 Mikroglia	3
1.2.1 Mikroglia: Funktion und Aktivierung im ZNS.....	3
1.2.2 Regulation der Aktivität von Mikroglia	4
1.2.3 Aktivierungsformen und Neuroinflammation/Neurodegeneration	5
1.2.3.1 Mikroglia und Neuroinflammation bei MS	6
1.2.3.2 Mikroglia und Neuroinflammation beim AD.....	6
1.2.3.3 Mikroglia und Neuroinflammation beim PD.....	7
1.3 Aldosteron	7
1.3.1 Synthese und Funktion	8
1.3.2 Mineralokortikoidrezeptor und Signaltransduktion.....	9
1.3.3 Aldosteron und Entzündung.....	9
1.4 Fragestellung	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Material	11
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	11
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien.....	11
2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer.....	14
2.1.4 Gebrauchsfertige Lösungen und Kits.....	17
2.1.5 Enzyme	17
2.1.6 Antikörper	17
2.1.7 Primer und Sonden.....	17
2.1.7.1 Primer.....	17
2.1.7.2 Sonden.....	17
2.1.9 Geräte und Hilfsmittel	18
2.1.10 Versuchstiere.....	19
2.1.11 Software	19

2.2 Methoden	20
2.2.1 Isolierung und Kultur primärer Mikroglia	20
2.2.2 Ernte der Mikroglia	21
2.2.3 Stimulation von Mikroglia	21
2.2.4 MTT-Test	21
2.2.5 Indirekte NO-Messung im Überstand der Zellkultur	22
2.2.6 Coomassie Blau Färbung	22
2.2.7 RNA-Isolierung	23
2.2.7.1 NucleoSpin®	23
2.2.7.2 Trizol®	24
2.2.7.3 Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der extrahierten RNA	25
2.2.8 cDNA-Synthese	25
2.2.9 MCR-Nachweis auf Mikroglia	26
2.2.9.2 Agarosegelelektrophorese	27
2.2.9.3 Qualitative Auswertung der Agarosegelelektrophorese	27
2.2.10 Relative qPCR mit dem TaqMan®-System	28
2.2.11 IL-6 und TNF- α Sandwich-ELISA	29
2.2.12 Western Blot	30
2.2.12.1 Zellablösung und Proteinisolierung	30
2.2.12.2 Bestimmung des Proteingehaltes	30
2.2.12.3 Vorbereitung der Proben für das Gel	30
2.2.12.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	30
2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung von NF κ B	32
2.2.14 Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse	33
2.2.15 Anfertigung und Gestaltung	33
3. Ergebnisse	34
3.1 MTT-Test	34
3.2 Morphologische Mikroglia-Zellkulturstudien	35
3.2.1 Einfluss von Aldosteron auf die Morphologie von Mikroglia	35
3.2.2 Einfluss von Aldosteron auf die Morphologie LPS-aktivierter Mikroglia	36
3.3 Nachweis des MCRs in Mikroglia	37
3.4 Reduktion der NO-Synthese durch Aldosteron in LPS stimulierten Mikroglia	38
3.4.1 Reduktion der NO-Freisetzung durch Aldosteron	38
3.4.2 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von iNOS durch Aldosteron	39
3.5 Aldosteroneinfluss auf die mRNA-Synthese pro-inflammatorischer Zytokine und Enzyme in LPS stimulierten Mikroglia mittels qPCR	40
3.5.1 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von TNF- α durch Aldosteron	40

3.5.3 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β durch Aldosteron	42
3.5.4 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von COX-2 durch Aldosteron	43
3.6 Einfluss von Aldosteron auf die Sekretion pro-inflammatorischer Proteine	
in LPS stimulierten Mikroglia mittels Sandwich-ELISA.....	44
3.6.1 Reduktion der Proteinsekretion von TNF- α durch Aldosteron	44
3.6.2 Reduktion der Proteinsekretion von IL-6 durch Aldosteron	45
3.7 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch Aldosteron in Mikroglia	46
3.7.1 Beeinflussung der Phosphorylierung der p38-MAPK zur Phospho-p38- MAPK durch Aldosteron mittels Western Blot	46
3.7.2 Immunfluoreszenz - Darstellung von intrazellulären Signalwegen über die Kerntranslokation von NF κ B	48
3.8 Ergebnisse des Methodenvergleiches zur RNA-Isolierung	
(Nucleospin[®] vs. Trizol[®]).....	49
3.8.1 Vergleich der Reinheitsgrade der isolierten mRNA	49
3.8.2 Methodenvergleich anhand der jeweiligen mRNA-Expressionsraten	50
3.8.2.1 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von TNF- α nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin [®] oder Trizol [®]	51
3.8.2.2 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von IL-6 nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin [®] oder Trizol [®]	52
3.8.2.3 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin [®] oder Trizol [®]	52
3.8.2.4 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von COX-2 nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin [®] oder Trizol [®]	54
4. Diskussion.....	55
4.1 Primäre Mikrogliakultur	55
4.2 Aldosteron als geeignete Substanz – MTT-Test und Rezeptornachweis	56
4.3 Einfluss auf die NO-Synthese durch Aldosteron	56
4.4 Beeinflussung der mRNA- und Proteinsynthese von pro-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen.....	57
4.5 Beteiligung intrazellulärer Signalwege.....	59
4.6 Aldosteron in der Zukunft – ein Ausblick.....	59
4.7 Methodenvergleich – Einfluss der Probenreinheit auf die Ergebnisse	60
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis.....	64
Publikationen	VIII

Danksagung	VIII
Erklärung	X

II. Abkürzungsverzeichnis

α -Syn	α -Synuclein
ACE	<i>angiotensin-converting-enzyme</i>
AD	<i>Alzheimers disease</i> (Morbus Alzheimer)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Aldo	Aldosteron
AK	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
β -ME	β -Mercaptoethanol
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i> (Serumalbumin aus dem Rind)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX-2	Cyclooxygenase-2
Csf1	<i>colony stimulating factor 1</i> (Koloniestimulierender Faktor 1)
CX ₃ CL1	Fraktalkin 1
CX ₃ CR1	Fraktalkin 1 Rezeptor
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylfumarat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENAc	epithelialer Natriumkanal
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
FKS	Fetales Kälberserum
HCl	Salzsäure
HRP	<i>Horseraddish-Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HWZ	Halbwertszeit
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-34	Interleukin-34
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

Irf8	<i>interferon regulatory factor 8</i> (Interferon regulierender Faktor 8)
LPS	Lipopolysaccharid
MCR	Mineralokortikoidrezeptor
MDB	<i>membrane desalting buffer</i> (Membran entsalzender Puffer)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten Ribonukleinsäure)
MS	Multiple Sklerose
MTT	3[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	<i>Parkinsons disease</i> (Morbus Parkinson)
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Runx1	<i>Runt-related transcription factor</i> (Runt bezogener Transskriptionsfaktor)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Sauerstoff-Radikale)
SAv-HRP	HRP-konjugiertes <i>Streptavidin</i>
SDS	Natriumduodecylsulfat
Sirp- α	<i>signal-regulatory protein α</i> (signalregulierendes Protein α)
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween20</i> (TBS-T-Puffer)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> (transformierender Wachstumsfaktor β)
TMB	Tetramethylbenzidin-Peroxidase-Substrat
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Neuronale Signale und deren Rezeptoren auf Mikroglia.....	5
Abb. 1.2	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	8
Abb. 3.1	Toxizitätsprüfung von Aldosteron auf Mikroglia.....	34
Abb. 3.2	primäre Mikroglia in Ruheform.....	35
Abb. 3.3	Aktivierungsgrade primärer Mikroglia im Vergleich.....	36
Abb. 3.4	Nachweis des MCR in Mikroglia.....	37
Abb. 3.5	NO-Freisetzung nach 6 und 24 Stunden.....	38
Abb. 3.6	iNOS-mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden.....	39
Abb. 3.7	TNF- α -mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden.....	40
Abb. 3.8	IL-6-mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden.....	41
Abb. 3.9	IL-1 β -mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden.....	42
Abb. 3.10	COX-2-mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden.....	43
Abb. 3.11	Einfluss von Aldosteron auf die Proteinfreisetzung von TNF- α nach 6 und 24 Stunden.....	44
Abb. 3.12	Einfluss von Aldosteron auf die Proteinsekretion von IL-6 nach 6 und 24 Stunden.....	45
Abb. 3.13	Einfluss von Aldosteron auf den Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK- Signalweg; Darstellung eines repräsentativen Blots.....	46
Abb. 3.14	Einfluss von Aldosteron auf den Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK- Signalweg; Diagramm.....	47
Abb. 3.15	Aldosteron-Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B.....	48
Abb. 3.16	Unterschiede in des mRNA-Reinheitsgrades zwischen der mRNA-Isolierung durch Trizol [®] oder Nucleospin [®]	49
Abb. 3.17	Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von TNF- α	51
Abb. 3.18	Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von IL-6.....	52
Abb. 3.19	Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β	53

Abb. 3.20	Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von COX-2.....	54
-----------	--	----

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersichtstabelle: qPCR-Werte nach RNA-Isolierung durch Trizol® oder Nucleospin®.....	50
--------	---	----

1. Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, wie die Multiple Sklerose (MS), der Morbus Alzheimer (AD), der Morbus Parkinson (PD), die Chorea Huntington oder die Amyotrophe Lateralsklerose gewinnen heute, durch die sich stetig weiterentwickelnde medizinische Versorgung und die steigende Lebenserwartung, immer mehr an Bedeutung. Die Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen des Nervensystems liegt dabei im schleichend progredienten und oftmals autonomen Untergang von Neuronen, dessen Ursachen bis heute noch nicht ausreichend erforscht sind. Vermutlich liegen der Pathogenese dabei sowohl genetische, als auch umweltbedingte Faktoren zu Grunde, die zu einer Inflammation im Nervensystem mit Gewebeuntergang führen. Die Tatsache, dass die meisten Neurone nicht über die Fähigkeit zur Regeneration verfügen, führt dazu, dass eine physiologische Wiederherstellung der untergegangenen Neurone nicht möglich ist.

In dieser Arbeit liegt der Fokus dabei auf der MS, dem AD und dem PD.

1.1.1 Multiple Sklerose

Die MS oder auch *Encephalomyelitis disseminata* wurde erstmals durch Augustus Frederick d'Este in der Zeitspanne von 1822 bis 1846 in dessen privaten Tagebüchern beschrieben (1). Die erste medizinische Niederschrift geht auf das Jahr 1840 zurück und wird dem schottischen Augenarzt William MacKenzie zugeschrieben (2). Bei der MS handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die mit einer Demyelinisierung, also einem Untergang der für die Signalweiterleitung nötigen Markscheiden, einhergeht. Dabei wird heute je nach Verlauf der Erkrankung in mehrere Formen unterschieden: Schubförmig remittierende MS, sekundär progrediente MS und primär progrediente MS. Neben den möglichen typischen Symptomen, wie Retrobulbärneuritis, Parästhesien, Paresen, Spastiken, Nystagmen, skandierende Sprache, Intentionstremor und Fatigue ist auch ein junges Alter bei Erkrankungsbeginn typisch für die MS (3). So liegt das Erkrankungsalter meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (4).

Pathogenetisch kommt es bei der MS initial zu einer im zentralen Nervensystem verstreuten Entzündungsreaktion, deren Genese noch ungeklärt ist (3).

1.1.2 Morbus Alzheimer

Der AD wurde 1906 durch den deutschen Psychiater Alois Alzheimer in Tübingen zum ersten Mal an einer unter Demenz leidenden 51-jährigen Frau beschrieben (5). Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch den Abbau des Gedächtnisses einhergehend mit Amnesie, Apraxie, sensorischer und motorischer Aphasie, Agnosie und Apathie. Das mittlere Erkrankungsalter für AD liegt dabei um das 65. Lebensjahr. Studien zeigen, dass beide Geschlechter gleichermaßen betroffen sind und ein frühzeitiger Ausbruch der Erkrankung mit einer positiven Familienanamnese korreliert (6). Die genauen Ursachen sind bisher nicht bekannt. Jedoch geht man auch hier, wie bei der MS, davon aus, dass sowohl genetische Faktoren, als auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen.

Mittlerweile ist bekannt, dass es beim AD im Gehirn zu Ablagerungen zweier Proteine kommt, dem Tau-Protein sowie Plaques aus β -Amyloid. Diese Proteine nehmen dabei eine Schlüsselposition bei der Krankheitsentstehung ein. Pathophysiologisch bewirken sie eine Neuroinflammation einhergehend mit einer vermehrten Ansiedlung von Astrozyten und Mikroglia, die zu einer Neurodegeneration führen (5).

1.1.3 Morbus Parkinson

Die Parkinson-Erkrankung wurde im Jahre 1817 erstmalig von dem britischen Arzt, Apotheker und Paläontologen James Parkinson beschrieben (7). Als PD wird dabei die idiopathische Form der Erkrankung bezeichnet, die heute von der familiären und der sekundären Form unterschieden wird (8).

Die drei zur Parkinson-Trias zählenden Leitsymptome sind Akinese/Bradykinese, Rigor und Tremor, die gemeinsam für das typische klinische Bild sorgen. Zudem können die Standsicherheit (posturale Instabilität), Kognition, Sensorik und das vegetative Nervensystem beeinträchtigt sein (8). Das gemittelte Erkrankungsalter ist das 60. Lebensjahr, dabei ist eine Korrelation zwischen steigendem Lebensalter und Inzidenz zu beobachten (9).

Pathophysiologisch kommt es beim PD zu einem progredienten, degenerativen Untergang von Dopamin synthetisierenden melaninhaltigen Neuronen in der *Substantia nigra*, was zu einem zentralen Dopaminmangel führt und die Symptomatik verantwortet (8).

1.2 Mikroglia

Mikroglia wurden 1919 zum ersten Mal durch Pio el Rio-Hortega in einer wegweisenden Publikation beschrieben und als eigenständige, mit den Monozyten verwandte Zellform des ZNS bestimmt (10).

Heute gelten sie als die Makrophagen des ZNS, die embryogenetisch dem Mesoderm/Mesenchym entstammen und sich bereits in der frühen Embryonalphase über das gesamte Parenchym des ZNS verteilen (10). Insgesamt machen sie dort 5 - 20 % der Glia-Zellen aus (11), die je nach Aktivierungsgrad und Beziehung zu Astrozyten oder Neuronen, unterschiedliche Morphologien mit verschiedenen immunologischen Eigenschaften einnehmen können (10).

1.2.1 Mikroglia: Funktion und Aktivierung im ZNS

Heute gelten die Mikroglia als die erste Immunabwehr des ZNS (12), deren Aufgaben universell sind. So sind sie beispielsweise bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen des ZNS beteiligt, indem sie für den Abbau von untergehenden Neuronen, Zellkontakten und anderem Gewebe sorgen (13). Darüber hinaus spielen sie eine große Rolle bei pathologischen Ereignissen, wie Infektionen, Ischämien und Entzündungsreaktionen im Allgemeinen (14).

Durch ein komplexes Netzwerk an Signalwegen sind Mikroglia in der Lage mit Neuronen, Makroglia und anderen Komponenten des Immunsystems zu kommunizieren, um Signale für die Induktion ihrer Immunabwehrreaktionen wahrzunehmen (10). In einer Publikation von Nimmerjahn *et al.* aus dem Jahr 2005 wird geschildert, dass die ruhenden ramifizierten Mikroglia das Gewebe des intakten ZNS mit ihren Ausläufern *in vivo* aktiv durchkämmen und kontrollieren (14). Sobald die Mikroglia ein sie aktivierendes Signal empfangen, kommt es zu einer Umwandlung der ramifizierten Zellen in eine aktive, amöboide Zellform. Als aktivierendes Signal gilt dabei jedes Signal, das eine potentielle Gefahr für das Parenchym des ZNS darstellen könnte. Während der Aktivierung kommt es außer der morphologischen Veränderung der Mikroglia auch zu einer Modifizierung der Synthese und Sekretion von proteolytischen Enzymen, pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie der Expression von Oberflächenmolekülen. Unterschiedliche *in vitro* Studien haben bei der aktivierten amöboiden Form unter anderem eine veränderte Expression von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), dem *major histocompatibility complex class II* (MHC II) und diversen CD-Molekülen gezeigt (10, 13).

1.2.2 Regulation der Aktivität von Mikroglia

Physiologisch stehen im ZNS Aktivierung und Inaktivierung in einem Gleichgewicht. Durch eine Veränderung in eine Richtung kann dieses Gleichgewicht jedoch kippen (15), was im schlimmsten Fall zu einer Neurodegeneration (16, 17) oder einem verminderten Abbau von Zellresten, Neuronen und/oder synaptischen Verbindungen bei der Differenzierung des ZNS führen kann (18).

Dieses komplexe System unterliegt dabei einer strengen Kontrolle und einer vielseitigen Kommunikation zwischen Astrozyten, Neuronen und Mikroglia. Die Synthese von Interleukin-10 (IL-10) und des *transforming growth factors*- β (TGF- β) durch Astrozyten ermöglicht beispielsweise eine Unterdrückung der Mikroglia-Aktivierung, wodurch eine überschießende Immunreaktion unterdrückt bzw. reguliert werden kann (19). Für eine solche Regulation sorgen unter anderem auch bestimmte Oberflächenmoleküle wie *cluster of differentiation*-200 und -47 (CD200, CD47) auf intakten Neuronen, sowie der durch Astrozyten und Neurone freigesetzte Ligand CX₃CL1, indem sie an die korrespondierenden Oberflächenrezeptoren CD200R, CD172a/Sirp- α oder CX₃CR1 der Mikroglia binden und dort ein Verweilen in der ruhenden Form auslösen.

Kommt es allerdings zu einem Signalverlust, der einen Untergang der normalen Zellintegrität signalisiert, so kommt es zu einer rapiden Aktivierung von Mikroglia, um beispielsweise Zelldebris oder schädigende Zellen zu eliminieren. Dazu dienen in der Regel TREM2- und Purin-Rezeptoren auf der Oberfläche der Mikroglia, die über ihre Liganden (Glykoproteine/Glykolipide, ATP/ADP) einen neuronalen Gewebeuntergang und/oder eine neuronale Entzündungsreaktion detektieren und somit eine Aktivierung von Mikroglia induzieren können (15, 20). Eine zusammenfassende Darstellung der beschriebenen Vorgänge zeigt die nachfolgende Abbildung (Abb. 1.1).

Auch eine Vielzahl weiterer Moleküle, gebildet von anderen Zellen des Immunsystems, Pathogenen oder den Mikroglia selbst, sind in der Lage Mikroglia zu aktivieren. So können außer dem Lipopolysacharid (LPS) aus gramnegativen Bakterien auch Interferon- γ (IFN- γ), *cluster of differentiation CD40 ligand* (CD40L), Chemokine und Proteasen zu einer Mikroglia-Aktivierung führen (20, 21).

Zusätzlich setzen Neurone und Astrozyten Signalstoffe wie Interleukin-34 (IL-34) und *colony stimulating factor 1* (Csf1) frei, die die Proliferation und Erhaltung der Mikroglia je nach Immunlage regulieren, um so gegebenenfalls die Proliferationsrate der Mikroglia zu steigern (15).

Außer diesen exogenen Mechanismen zur Regulation existieren auch endogene Faktoren für regulatorische Prozesse der Mikroglia. Dazu zählen unter anderem der *Runt-related transcription factor* (RUNX1), der *family transcription factor Pu1* und der *interferon regulatory*

factor 8 (Irf8). Runx1 dient dabei der Proliferationskontrolle sowie der Homöostase von postnatalen Mikroglia und stößt den Übergang von der ruhenden, ramifizierten Form in die aktive, amöboide Form an (15, 22). Irf8 steht dem gegenüber und kann zu einer Reduktion und Dysregulation der Mikroglia führen (15, 23).

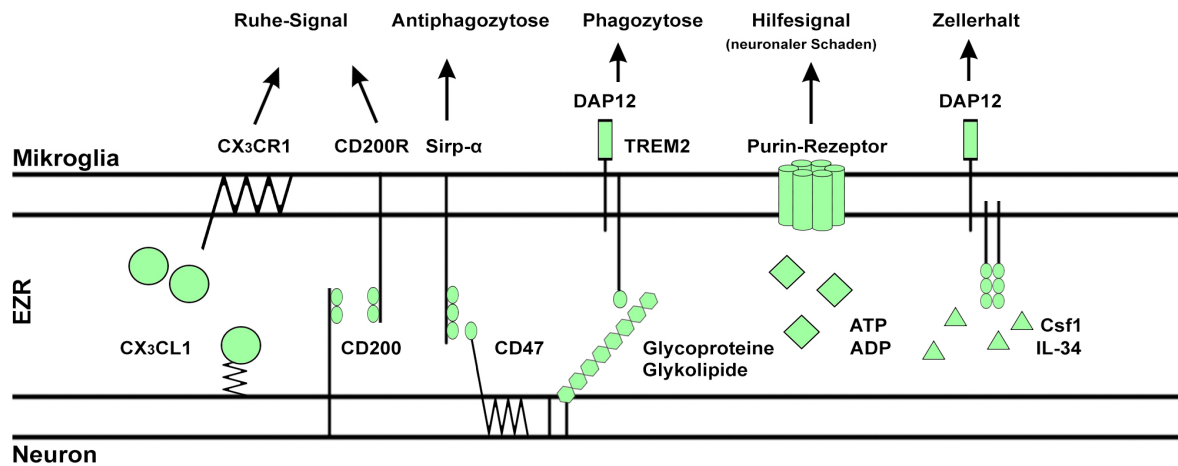


Abb. 1.1: Neuronale Signale und korrespondierende Rezeptoren auf Mikroglia - modifiziert aus Kierdorf et al. (15). Vielfalt an Botenstoff-Rezeptor-Interaktionen und Kommunikationswegen zwischen Mikroglia und Neuronen. Die verschiedenen neuronalen Botenstoffe lösen jeweils unterschiedliche mikrogliale Signale aus. CX₃CL1 und CD200 vermitteln ein Ruhe-Signal und sorgen für ein Verbleiben in der ruhenden Form. Parallel dazu vermittelt CD47 bei intaktem Neuron ein Antiphagozytosesignal an den Sirp-α-Rezeptor. Bei neuronalem Schaden lösen freigesetztes ATP und ADP an mikroglialen Purinrezeptoren ein Hilfesignal aus, was zur Mikroglia-Aktivierung führt. Weitere neuronale Botenstoffe signalisieren dabei am DAP12-Rezeptor, ob die Mikroglia die Phagozytose des defekten Neurons einleiten (Glycoproteine, Glykolipide), oder den neuronalen Zellerhalt induzieren sollen (Csfr1, IL-34).

1.2.3 Aktivierungsformen und Neuroinflammation/Neurodegeneration

Die in physiologischer Weise das Gehirn stetig überwachenden Mikroglia respondieren auf nahezu jede Art von Stimulus, der eine Gefahr für das ZNS darstellen könnte. Wird ein solches Signal (Infektion, Entzündung, Verletzung) erkannt, so kommt es zu einer schnellen Aktivierung der Mikroglia. Dies kann eine überschießende Immunreaktion auslösen, die zu einer Neuroinflammation mit sich anschließender Neurodegeneration führen kann, worauf in den nachfolgenden Kapiteln 1.2.3.1 bis 1.2.3.3 genauer eingegangen wird (20).

Neuere Studien zeigen, dass Mikroglia, wie die regulären Gewebemakrophagen, je nach Auslöser unterschiedliche Unterformen annehmen können. Es wird unterschieden in M1 und M2 Mikroglia, deren Immunantworten sich wesentlich unterscheiden. Durch eine Stimulation mit LPS oder IFN-γ kommt es zur Bildung des M1 Typs, der über die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen eine zytotoxische Wirkung mit sich bringt und die Phagozytose von Pathogenen und Zell-Debris ermöglicht. Ein Kontakt mit Interleukin-4 (IL-4)

und Interleukin-13 (IL-13) kann dem gegenüber zur Bildung des M2 Phänotyps mit neuroprotektiven Eigenschaften führen. Diese Mikroglia produzieren vermehrt TGF- β , IL-10, sowie Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren, die eine verbesserte Heilung und Reparatur von Gewebe medieren (20, 24, 25).

Es wird angenommen, dass es bei einer Gewebeschädigung zunächst zur Bildung des M2 Typs kommt, um einem Zelluntergang entgegen zu wirken. Wird der pathologische Prozess darüber hinaus nicht eingedämmt, tritt der Zelltod ein und es werden Faktoren zur weiteren Mikroglia-Aktivierung und Umformung in den M1 Phänotypen freigesetzt. Die M1 Mikroglia lösen dann eine Entzündungsreaktion mit chronischem Charakter aus und sorgen für die Phagozytose untergegangener Zellen (25).

Handelt es sich bei den phagozytierten Zellen um Neurone, so spricht man aufgrund der Unfähigkeit zur neuronalen Regeneration von einem neurodegenerativen Prozess, wie er unter anderem bei den neurodegenerativen Erkrankungen MS, AD und PD zu beobachten ist.

1.2.3.1 Mikroglia und Neuroinflammation bei MS

Die MS ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung im ZNS, die zur Demyelinisierung und Neurodegeneration führt. Dieser Entzündungsprozess sorgt für eine reaktive Aktivierung der Mikroglia, wodurch es zur mikroglialen Synthese und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β) sowie neurotoxischen Substanzen (Stickstoffmonoxid (NO), Sauerstoff-Radikale (ROS), proteolytische Enzyme) kommt (26). Diese Entzündungsmediatoren und Signalstoffe sorgen zusätzlich für eine Stimulation von Leukozyten und führen zu einer Infiltration dieser in das ZNS. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion, was zu einem gesteigerten Verlust von Markscheiden und Neuronen führt.

Ein Ansatz in der Therapie der MS liefert nun die kontrollierte Senkung dieser neuroinflammatorischen Signale über diverse pharmakologische Substanzen, um den *Circulus vitiosus* der sich immer mehr selbst verstärkenden Entzündung zu durchbrechen (27).

1.2.3.2 Mikroglia und Neuroinflammation beim AD

Beim AD kommt es durch die Ablagerung von Tau-Proteinen und die Bildung von Amyloid-Plaques zu einer reflektorischen Mikroglia-Aktivierung und Astrozytose in der Umgebung. Aufgabe der aktivierten Mikroglia ist die Phagozytose der nicht ins ZNS gehörenden Amyloid-Plaques. Die Aktivierung führt dabei auch zu einer verstärkten Produktion und Expression von pro-inflammatorischen Botenstoffen (TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6), neurotoxischen Molekülen (NO, ROS) und des Komplementfaktors C1q, die eine

Entzündungsreaktion auslösen und steuern können (6, 28). Diese kann zu einem reaktiven Untergang an Neuronen und Synapsen führen, wodurch es zu einem schleichenden Verlust des Gedächtnisses kommen kann. Eine mögliche therapeutische Option wäre eine gezielt herbeigeführte Blockade der die Entzündung auslösenden Signalwege, beispielsweise über eine kontrollierte Senkung der pro-inflammatorischen Botenstoffe (17, 28).

1.2.3.3 Mikroglia und Neuroinflammation beim PD

Ein progressiver Untergang von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* und den Nervenendigungen im *Striatum* führt beim PD zu der klassischen bewegungshemmenden Symptomatik. Auslöser für den Verlust der Neurone und Synapsen ist vor allem ein entzündlicher Prozess, der von ortsständigen Mikroglia mediert wird (29, 30).

Die Ursache für die Entzündung in den Basalganglien ist die Ablagerung von α -Synuclein (α -Syn) und anderen Proteinkomplexen, den sogenannten Lewy-Körperchen. Zudem wird darüber spekuliert, dass eine systemische Entzündung zu einer Neuroinflammation mit Neurodegeneration führen kann (30). Nachweislich führen die Ablagerungen des α -Syn zu einer Mikroglia-Aktivierung mit einhergehender Synthesesteigerung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β . Diese Ablagerungen lösen daraufhin eine Entzündungsreaktion aus, bei der dopaminerge melaninhaltige Neurone zugrunde gehen (31). Das dabei frei werdende Neuromelanin führt zu einer verstärkten Mikroglia-Aktivierung mit Synthese von TNF- α und der Syntheseinduktion von IL-6 und NO, was zu einer weiteren Auto-Verstärkung der Entzündungsreaktion führt (32). Dieser auch hier vorkommende *Circulus vitiosus* liefert einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt zur Durchbrechung bzw. Senkung des pro-inflammatorischen Geschehens (17).

1.3 Aldosteron

Aldosteron ist ein im Kortex der Nebenniere natürlich gebildetes Steroidhormon aus der Gruppe der Mineralokortikoide, welches physiologisch vorwiegend bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes mitwirkt (33). Die ersten Beschreibungen der Nebenniere und ihrer Funktion gehen dabei auf Bartolomeo Eustacchio im Jahr 1563 zurück (34).

1849 beschrieb Thomas Addison dann erstmals die einzelnen Symptome einer Nebennierenrindeninsuffizienz und legte damit den Grundstein für die weitere Erforschung der Nebenniere, der von ihr produzierten Hormone und deren Funktionen. Erst ein knappes Jahrhundert später gelang es den Wissenschaftlern Simpson und Tait das auch als Electrocortin bezeichnete Aldosteron zu isolieren (34).

1.3.1 Synthese und Funktion

Die Bildung von Aldosteron erfolgt in mehreren Syntheseschritten in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde auf Grundlage von Cholesterin (33). Über die Zwischenstufe Pregnenolon entsteht durch Oxidation am C3-Atom aus Cholesterin das Progesteron. Über weitere sich anschließende Hydroxylierungen kommt es zur Bildung von 18-Hydroxycorticosteron, das in einem letzten Schritt noch einmal am C18-Atom zu Aldosteron oxidiert wird (35).

Aldosteron bildet den letzten Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und stellt bei seiner Ausschüttung eine Anhebung des Blutvolumens und Blutdrucks sicher. Durch die Bindung von Aldosteron an Mineralokortikoid-Rezeptoren (MCR) im distalen Tubulus der Nieren kommt es zu einem verstärkten Einbau von Natrium-Kanälen (ENac) und Natrium-Kalium-Transportern (Na^+/K^+ -ATPase) in die interstitielle Zellmembran. Dies führt dazu, dass vermehrt Kaliumionen ausgeschieden und verstärkt Natriumionen zurückresorbiert werden. Mit dem nach innen gerichteten Strom der Natriumionen kommt es automatisch zu einer osmotisch bedingten verstärkten Rückresorption von Wasser, was über eine Erhöhung des Blutvolumens zu dem besagten Anstieg des Blutdruckes führt. Die Ausschüttung von Aldosteron unterliegt dabei einer strengen Regulation, sowie negativen Feedbackmechanismen über Angiotensin II (Ang II). Ein erniedrigter Blutdruck führt zu einer Aktivierung des RAAS und darüber zu einem Anstieg von Ang II, welches die Aldosteron-Ausschüttung induziert (33).

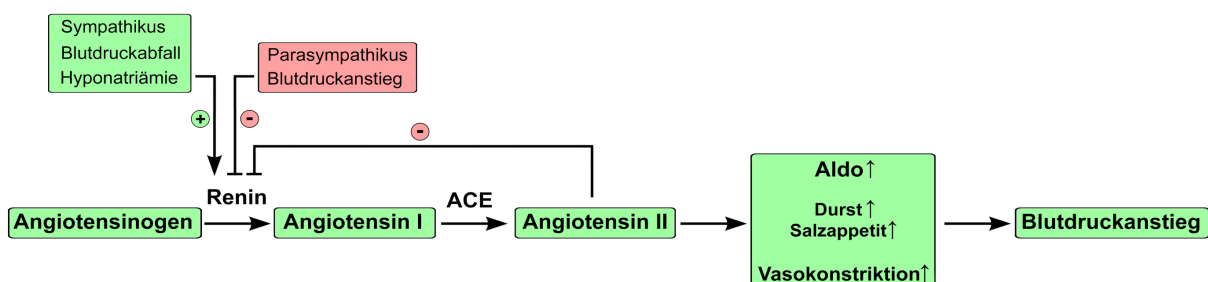


Abb. 2.2: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Ausgang des RAAS ist Angiotensinogen, welches durch Renin zu Angiotensin I und durch das *angiotensin-converting-enzyme* (ACE) weiter zu Angiotensin II (Ang II) umgewandelt wird. Über Rezeptorinteraktionen führt der Anstieg von Ang II zu einem Anstieg von Aldosteron, Durstgefühl, Salzappetit und einer verstärkten Vasokonstriktion, was für einen Blutdruckanstieg sorgt. Reguliert wird das RAAS dabei über die Renin-Aktivität, die zum einen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus des Ang II und zum anderen einen hohen Blutdruck und/oder eine erhöhte parasympathische Aktivität herunterreguliert wird. Ein Blutdruckabfall, eine erhöhte Sympathikusaktivität und/oder eine Hyponatriämie führen hingegen zu einer Heraufregulation der Reninaktivität.

1.3.2 Mineralokortikoidrezeptor und Signaltransduktion

Der MCR bindet sowohl Mineralokortikoide, als auch Glukokortikoide mit jeweils unterschiedlicher Affinität und kommt vor allem in der Niere und im Kolon vor. Hier unterstützt der MCR unter anderem die Regulation des Wasserhaushaltes über den Transport von Natriumionen (36). Außer dem Vorkommen des MCR in der Niere und im Kolon, ist auch ein Vorliegen dieses Rezeptors im Herzen, in Blutgefäßen und im Gehirn bekannt (36, 37). Weitere Studien haben bereits gezeigt, dass der MCR im Gehirn auch auf Mikroglia vorkommt, so dass hier ebenfalls Effekte durch Aldosteron zu erwarten sind (38).

Nach einer Aktivierung des intrazellulär gelegenen MCR durch einen passenden Liganden kommt es zur Translokation des Rezeptors in den Kern, wo dieser selbst als Transkriptionsfaktor fungiert oder andere Signalkaskaden im Zytosol, wie beispielsweise den p38-MAP-Kinase Signalweg, den ERK-Sp1-Signalweg oder den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren kann (39).

1.3.3 Aldosteron und Entzündung

Heute ist bekannt, dass Aldosteron zellspezifisch auch eine Rolle bei Entzündungen spielen kann. So kann es beispielsweise in höheren Konzentrationen Entzündungsreaktionen am Herzen und/oder an Gefäßen auslösen, die mit einer nachgeschalteten Fibrose einhergehen können. Durch eine Bindung von Aldosteron an den endothelialen MCR kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS in ortsständigen Makrophagen. Das führt zu einer lokalen Stimulation und Erhöhung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Transskriptionsfaktoren bis hin zu einer Entzündung mit Zellverlust (40). Darüber hinaus führen erhöhte Aldosteron-Konzentrationen auch zu einem vaskulären Hypertonus, der über unterschiedliche Wege ebenfalls einen entzündlichen Prozess am Endothel induzieren kann (41). Studien aus dem Jahr 2012 untersuchten die Effekte von Aldosteron bei Uveitis und zeigten, dass eine mikrogliale MCR-Aktivierung durch Aldosteron jedoch auch mit einer Senkung von Entzündungsreaktionen einhergehen kann, was den Grundstein dieser Arbeit legte (42).

1.4 Fragestellung

Die in den Abschnitten 1.2.2 bis 1.3.3 aufgeführten Fakten lassen darauf schließen, dass Aldosteron außer der antidiuretischen Wirkung in den distalen Tubuli der Nieren auch einen Einfluss auf Entzündungsvorgänge im ZNS haben kann. Durch das Vorkommen des MCR in Mikroglia liegt eine mögliche regulierende Wirkung von Aldosteron auf mikrogliale Prozesse nahe. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen, denen in dieser Arbeit nachgegangen werden soll.

1. Besitzen Mikrogliazellen in der Zellkultur den MCR?
2. Welchen immunmodulatorischen Einfluss übt Aldosteron über den MCR auf primäre Ratten-Mikroglia aus?
3. Welche Signalkaskaden spielen dabei eine mögliche Rolle?

Zusätzlich soll untersucht werden, ob unterschiedliche Methoden zur RNA-Isolierung eine Auswirkung auf die Reinheit der isolierten RNA haben und welchen Einfluss dies möglicherweise auf die weiteren Versuchsergebnisse ausübt. Dafür sollen zum einen die Ergebnisse der RNA-Isolierung mittels NucleoSpin® (2.2.7.1) mit denen der RNA-Isolierung mittels Trizol® (2.2.7.2) verglichen und zum anderen die unterschiedlich isolierten RNAs in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) eingesetzt und die Ergebnisse gegenübergestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

96-PCR-Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser, 22 x 22 mm	Menzel, Braunschweig
Objektträger, 76 x 26 mm	Carl Roth, Karlsruhe
ELISA 96-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
Gewebekulturschälchen (60 x 15 mm)	Sarstedt, Nürnberg
<i>Multiply</i> Reaktionsgefäße (150 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
PVDF-Membran „Hybond P“	Amersham Pharmacia, UK
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Whatmann-Pappe	GE, Freiburg
Zellkulturflaschen 75 cm ² mit Filterdeckel	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten (6/12/24 Vertiefungen)	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (10 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien

Acrylamid / Bisacrylamid (29:1)	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich, Hamburg
Aldosteron	Sigma-Aldrich, Torfkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Fisher Scientific, Schwerte
Azeton	Carl Roth, Karlsruhe
β-Glycerol-Phosphat	Sigma, Hamburg
Bisbenzimid B-2883	Sigma-Aldrich, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Riedel-de-Haen, Seelze

Chloroform	Sigma-Aldrich, Hamburg
<i>DNA-ladder</i> 100bp	Solis Biodyne, USA
<i>DNA-loading Dye</i> (6x) (Ladepuffer)	Thermo-Scientific, USA
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dulbecco's <i>Modified Eagle</i> Medium (DMEM) (4,5 g/l D-Glucose; 4 nM L-Glutamin)	Invitrogen, Darmstadt
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Merck Schuchardt, Hohenbronn
Glycin	Applichem, Darmstadt
Glykogen	Sigma-Aldrich, Hamburg
Griess-Reagenz	Sigma-Aldrich, Hamburg
HEPES (2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperaziny-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Immu- <i>Mount</i> Eindeckmedium	Thermo Scientific, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaisers-Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
Lipopolysacharid (LPS) aus <i>Salmonella typhymurium</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Reformhaus, Kiel
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumduodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natrium-Pyrophosphat	Sigma, Hamburg
Natrium-Vanadat	Sigma, Hamburg
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N- Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin in PBS	PAN Biotech, Aidenbach
peqGreen	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Phenylmethyl-sulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Hamburg
RNAse freies <i>Aqua bidest</i>	Merck Milipore Synergy UV Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Servablue (Coomassie Blau)	Serva, Heidelberg
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Thiazolyl <i>Blue</i> Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trizol	Qiagen, Hilden
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

Coomassie Farblösung	1 g	Coomassie Blau
	450 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	450 ml	<i>Aqua bidest</i>
Dissoziationslösung	0,024 g	HEPES
	0,020 g	Trypsin
	0,002 g	EDTA
	<i>ad</i> 10 ml	DMEM
Entfärbelösung für Coomassie-Färbung	450 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	450 ml	<i>Aqua bidest</i>
Sammelgel (4,5 %)	2,60 ml	Gelpuffer II
	1,67 ml	Acrylamid
	5,79 ml	<i>Aqua bidest</i>
	60 µl	APS (10 %)
	30 µl	TEMED
Solubilisierungslösung	20 g	SDS, in 70 ml DMF (50 %)
	2,5 ml	Essigsäure (80 %)
	2,5 ml	1N HCl
Tris-gepufferte Saline Tween (TBS-T)	20 mM	Tris (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,10 %	Tween20

Trenngel (12,5%)	2,5 ml	Gelpuffer I
	4,17 ml	Acrylamid
	3,29 ml	<i>Aqua bidest</i>
	60 µl	APS (10 %)
	30 µl	TEMED
Zamboni Fixierlösung	8 g	Paraformaldehyd gelöst bei 60°C in
	35 ml	gesättigter Pikrinsäure
	ad 200 ml	Phosphatpuffer
Zellkulturmedium für Mikroglia	500 ml	DMEM
	60 ml	FKS (für 30 min bei 44-53 °C inaktiviert)
	5 ml	L-Glutamin (200 mM)
	6 ml	Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)
Zellstimulationsmedium für Mikroglia	500 ml	DMEM
	60 ml	FKS (für 30 min bei 56 °C inaktiviert)
	6 ml	Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)
Elektrodenpuffer (Laufpuffer pH 8,2)	12,2 g	Tris
	57,6 g	Glycin
	4 g	SDS
	ad 4 l	<i>Aqua bidest</i>
Gelpuffer I für Trenngel (pH 8,8)	45,13 g	Tris HCl (1,5 M)
	1 g	SDS (0,4 %)
	ad 250 ml	<i>Aqua bidest</i>

Gelpuffer II für Sammelgel (pH 6,8)	15,10 g	Tris HCl (0,5 M)
	1 g	SDS (0,4 %)
	<i>ad</i> 250 ml	<i>Aqua bidest</i>
Lysis-Puffer für Gesamtprotein	100 mM	NaCl
	50 mM	Tris (pH 7,5)
	5 mM	EDTA
	1 %	Triton x-100
	2 mM	Natrium-Vanadat
	2,5 mM	Natrium-Pyrophosphat
	1 mM	β -Glycerol-Phosphat
	1 mM	PMSF
SDS-Probenpuffer	0,23 g	SDS
	1,25 ml	Gelpuffer II
	1 ml	Glycerin
	50 mM	DTT
	<i>ad</i> 10 ml	<i>Aqua bidest</i>
Transferpuffer (pH 9,0)	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	10 %	Methanol
	<i>ad</i> 2,5 l	<i>Aqua bidest</i>
ELISA-Waschpuffer	80 g	NaCl
	11,6 g	Natriumhydrogenphosphat
	2 g	Kaliumhydrogenphosphat
	2 g	Kaliumchlorid
	<i>ad</i> 1 l	<i>Aqua bidest</i>
	(1:10 verdünnen + 0,05 % Tween)	

2.1.4 Gebrauchsfertige Lösungen und Kits

BD OptEIA™ Set für TNF-α oder IL-6 ELISA	Biosciences, USA
d-NTP-Mix 5-Prime (10 nm)	Thermo Scientific, Hilden
ECL-Kit	GE, Freiburg
NucleoSpin® RNA-Kit	Macherey-Nagel, Düren
RQ1 RNase-free-DNase-Kit	Promega, Mannheim
TaqMan® Universal PCR Mastermix	Life technologies, Darmstadt

2.1.5 Enzyme

DreamTaq-Polymerase	Thermo Scientific, USA
Revert Acid™ H Minus M-MuL V (200 U/μl) Reverse Transskriptase	Thermo Scientific, USA
Thermus Aquaticus DNA-Polymerase (5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Antikörper

NFκB-Antikörper (200 μl/ml)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-rabbit Alexa Fluor A 31628 (100 μl/ml)	Invitrogen, USA
Phospho-p38 MAPK XP® Rabbit mAb (100 μl/ml)	Cell Signaling, USA
p38 MAPK Antibody (200 μl/ml)	Cell Signaling, USA
goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 (100 μg/ml)	Santa Cruz, Heidelberg

2.1.7 Primer und Sonden

2.1.7.1 Primer

Random Hexamer Primer	Thermo Scientific, USA
MCR Primer (Sequenzen: Kapitel 2.2.9.1)	Sigma-Aldrich, Hamburg

2.1.7.2 Sonden

COX-2 Rn00568225_m1	Life technologies, Darmstadt
18S-rRNA human Hs99999901_s1	Life technologies, Darmstadt

iNOS (NOS2) Rn00561646_m1

Life technologies,
Darmstadt

IL-1 β rat Rn00580432_m1

Life technologies,
Darmstadt

IL-6 Rn00561420_m1

Life technologies,
Darmstadt

TNF- α Rn99999017_m1

Life technologies,
Darmstadt

2.1.9 Geräte und Hilfsmittel

Elektrophoresekammer

Bio-Rad, München

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M

Carl Zeiss, Göttingen

Fusion SL Vilber Lourmat

peqlab, Erlangen

Gefrier-/Kühlschrank

Bosch, Stuttgart

Gefrierschrank (-70 °C)

Heraeus, Hanau

Gelgießstand

Bio-Rad, München

Inkubator Hera Cell 150

Heraeus, Hanau

Mikroskop Axiokop

Zeiss, Jena

Mikrotiterplatten-Photometer
(SLT Reader 340 ATTC)

SLA Laborinstrumente,
Karlsruhe

Multi-Volume-Spektroskop Epoch

BioTek, Bad Friedrichshall

Neubauer Zählkammer (0,0025 cm², Tiefe 0,1 mm)

Carl Roth, Karlsruhe

Pipetten (1-1000 μ l)

Eppendorf, Hamburg

Sicherheitswerkbank HERASafe[®]

Heraeus, Hanau

Spannungsquelle Power Pac²⁰⁰

Bio-Rad, München

Take3™ Multi-Volume Platte

BioTek, Bad Friedrichshall

Thermal Cycler Gene AMP[®]
PCR System 9700

Applied Biosystems,
Darmstadt

Thermocycler ABI 7500 fast

Applied Biosystems,
Darmstadt

Thermomixer Compact

Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge 5415 R

Eppendorf, Hamburg

Trans-Blot® Turbo™

Bio-Rad, München

Vortex Genie 2

Scientific Industries, USA

Präzisionswaage BP 610

Sartorius AG, Göttingen

Rollmischer

Zieperer GmbH, Eltzbach

Wasserbad

Köttermann,
Uetze/Hänsigen

2.1.10 Versuchstiere

Für die Versuche dieser experimentellen Arbeit wurden die Mikroglia aus zwei Tage alten Ratten entnommen. Bei den Tieren handelte es sich um Ratten des Stammes Sprague Dawley, die unter Standardbedingungen nach geltender EU-Norm im Tierhaus der vorklinischen Institute der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gehalten wurden. (Genehmigung des MELUR, V 312-7224.121-13)

2.1.11 Software

ABI Prism 7500 *fast*

Applied Biosystems, USA

Adobe Photoshop CC™

Adobe Systems Inc., USA

AxioVision LE™

Carl Zeiss, Göttingen

EasyWin 32

Herolab, Wiesloch

GraphPad Prism 5

Graphpad Software, USA

Microsoft® Word für Mac 2011

Microsoft, USA

Microsoft® Excel für Mac 2011

Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Kultur primärer Mikroglia

Die Isolierung der Mikroglia erfolgte aus den Gehirnen von Sprague Dawley Ratten am postnatalen Tag 2 (P2), wobei der Tag der Geburt als Tag 0 festgelegt wurde.

Zur Zellgewinnung wurden die Tiere nach geltender Norm dekapitiert, die Gehirne *post-mortem* herauspräpariert und in einer Gewebekulturschale (100x15 mm) in 1 %iger Penicillin/Streptomycin-Lösung in PBS gesammelt. Unter optischer Kontrolle mittels Binokular wurden zunächst von jedem Gehirn die Meningen und der Hippocampus abpräpariert, bevor die weitere Präparation der Kortexhälften und des vorderen *Mesencephalon* erfolgte. Anschließend wurden jeweils die Kortexhälften und die *Mesencephali* in separate Gewebekulturschalen (35x15 mm) in 3 ml PBS überführt und gespült. Es folgte die Zerkleinerung der Präparate mittels eines Einmalskalpells unter einer Sterilwerkbank, um das Gewebe für die weitere Zellisolierung durch enzymatische und mechanische Dissoziation vorzubereiten. Dafür wurde das zerkleinerte Zellmaterial aus jeweils einer Gewebekulturschale in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und der Überstand nach Absinken der Gewebeteilchen vorsichtig abgesaugt, bevor 3 ml Dissoziationslösung unter Zugabe von 35 µl DNAse I (1 mg/ml) zu jedem Ansatz hinzu pipettiert wurden. Die Ansätze wurden bei 37 °C für 30 Minuten im Inkubator bei 8,4 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Dissoziationslösung vorsichtig entfernt und die Trypsinaktivität durch die Zugabe von 2 ml serumhaltigen Zellkulturmedium gestoppt. Die weitere Dissoziation und Vereinzelung der Zellen erfolgte durch mehrfaches Resuspendieren von verbliebenen Gewebeteilchen mittels einer durch Feuer verengten Pasteurpipette unter Zugabe von 50 µl DNAse I (1 mg/ml). Anschließend wurden die Zellen von je zwei *Cortices* oder je zwei *Mesencephali* in 75 cm² Zellkulturflaschen in 10 ml Zellkulturmedium für Mikroglia ausgesät. Dabei wurde darauf geachtet, dass es für die Kultivierung nicht zur Vermischung der Zellen aus den *Cortices* und der *Mesencephali* kommt, da die Zellen des Kortex über eine schnellere Wachstumsgeschwindigkeit verfügen.

Die Kultivierung erfolgte anschließend bei 37 °C und einer Begasung von 8,4 % CO₂ in einem Inkubator. Zur ausreichenden Versorgung der Zellen wurde das Medium bis zur Ernte der Mikroglia alle zwei Tage gewechselt.

2.2.2 Ernte der Mikroglia

Nach einer Kultivierungszeit von acht bis zehn Tagen wurden die Mikroglia durch manuelles Schütteln vom Astrozytenzellrasen abgelöst und mitsamt des Zellkulturmediums in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das am Grund verbliebene Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Für die anschließende Zellzahlbestimmung der vitalen Mikroglia wurden 10 µl der Zellsuspension und 10 µl Trypanblau in einem Reaktionsgefäß miteinander vermischt und 10 µl dieses Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter einem Mikroskop die vitalen Mikroglia ausgezählt und diese je nach weiterer Versuchsplanung in zuvor definierter Zellzahl in den entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät. Vor der Stimulation wurden diese dann für 24 Stunden bei 37 °C und einer 8,4 %igen CO₂-Begasung im Inkubator gehalten, um ein Adhären der Mikroglia zu gewährleisten.

2.2.3 Stimulation von Mikroglia

Vor der Stimulation wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt. Die anschließende Stimulation erfolgte in Stimulationsmedium, welches mit 5 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von Aldosteron (200 nM) versetzt worden war. Zudem wurden Einzelstimulationen von Aldosteron und nicht stimulierte Kontrollen durchgeführt. Alle Aldosteron enthaltenden Ansätze wurden dabei für 30 Minuten mit Aldosteron präinkubiert. Je nach Versuchsanordnung erfolgte jeweils eine Inkubation der einzelnen Ansätze bei 37 °C und 8,4 % CO₂-Begasung über verschiedene Zeiträume.

2.2.4 MTT-Test

Der MTT-Test nach Mosmann (43) dient der Überprüfung des Zellüberlebens nach einem Kontakt mit einer anderen Substanz, wie in dieser Arbeit mit Aldosteron. Dabei bedient man sich der photometrischen Bestimmung eines Umwandlungsprozesses, der nur in den Mitochondrien lebender Zellen ablaufen kann. Es wird die chemische Umwandlung des wasserlöslichen, gelben 3[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid (MTT) in wasserunlösliches, violett-blaues Formazan bestimmt.

Zur Durchführung des MTT-Tests wurden jeweils 100.000 Mikroglia pro 100 µl Medium in eine 96er Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden mit LPS in An- oder Abwesenheit von Aldosteron, reiner Aldosteron-Stimulation oder unbehandelten Kontrollzellen, wurden die Zellkulturüberstände abgesaugt und die Zellen jeweils dreimal mit 200 µl PBS gewaschen, bevor zu jedem Ansatz 100 µl frisches Medium sowie 25 µl MTT-Lösung pipettiert und die Ansätze im Inkubator für zwei Stunden bei 37 °C und einer

8,4 %igen CO₂-Begasung inkubiert wurden. Nach erfolgter Inkubation wurden zur Zell- und Kristall-Lyse je 100 µl Solubilisierungslösung pipettiert und die Ansätze erneut für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Vor der photometrischen Messung der Absorption bei 540 nm wurden mittels eines Kunststoffspatels in jedem Ansatz mögliche Formazankristalle noch einmal mechanisch durch Rühren aufgelöst.

2.2.5 Indirekte NO-Messung im Überstand der Zellkultur

Aktivierete Mikroglia sezernieren Stickstoffmonoxid (NO), so dass dieses als ein anerkannter Parameter für die Aktivierung der Mikroglia gilt. Gekennzeichnet durch eine kurze Halbwertszeit von wenigen Sekunden ist NO selbst nicht nachweisbar. Das NO reagiert jedoch mit H₂O und OH⁻ weiter zu den stabileren Metaboliten NO₂ und NO₃. Ausgehend davon, dass die Menge des gebildeten NO₂ proportional zum ursprünglich produzierten NO ist, erfolgte die NO-Messung somit indirekt über eine Reaktion des NO₂ mit dem Griess-Reagenz. NO₂ reagiert in einem ersten Schritt mit Sulfanilamid des Reagenzes zu einem ersten Komplex, der dann in einem weiteren Schritt mit N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin zu einem violett gefärbten Komplex reagiert. Für die endgültige Auswertung folgt eine photometrische Bestimmung der Farbintensität.

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden jeweils 100.000 Mikroglia in eine 96er Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Stimulationsdauer von 6 oder 24 Stunden mit LPS in An- oder Abwesenheit von Aldosteron, mit Aldosteron allein oder Kontrollzellen wurden je 100 µl der Zellkulturüberstände in die Vertiefungen einer neuen 96er Zellkulturplatte überführt, mit 100 µl Griess-Reagenz vermischt und das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Absorption photometrisch im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenz 620 nm) gemessen wurde.

2.2.6 Coomassie Blau Färbung

Um mögliche morphologischen Veränderungen der Mikroglia darzustellen, wurde eine Coomassie Blau Färbung (*Coomassie-Blue*) durchgeführt.

Für die Durchführung wurden jeweils 100.000 Mikroglia pro 100 µl Medium auf Deckgläsern ausgesät, die sich in 6er-Zellkulturplatten befanden. Nach einer 30 minütigen Adhärenz erfolgte eine 6- oder 24-stündige Stimulation der Mikroglia mit LPS in der An- oder Abwesenheit von Aldosteron. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült. Es folgte eine Fixierung mit 30 µl 2,5 %igem Glutaraldehyd über einen Zeitraum von 40 Minuten und drei weitere Spülvorgänge mit PBS. Zur Färbung wurden die Zellen mit je 50 µl Coomassie-Blau Färbelösung für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an

die Inkubationszeit wurden die nun angefärbten Zellen erneut dreimal mit PBS gespült und Farbüberschüsse durch mehrfaches Spülen mit 75 µl Coomassie-Blau Entfärbelösung entfernt. Vor der mikroskopischen Auswertung wurden die Deckgläser mit *Aqua bidest* gespült und abschließend auf Objektträgern mit Kaisers Glycingelantine eingedeckt.

2.2.7 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte zum einen mittels NucleoSpin® und zum anderen mittels Trizol®, um neben dem Aufdecken einer möglichen immunmodulatorischen Wirkung des Aldosterons auf Mikroglia zuzüglich diese RNA-Isolierungsmethoden in Hinsicht auf die Reinheit der isolierten mRNA und der daraus resultierenden PCR-Ergebnisse zu vergleichen. Dieser Vergleich erfolgte mittels anschließender qPCR der aus beiden Verfahren gewonnenen Proben.

2.2.7.1 NucleoSpin®

Bei der RNA Isolierung mit NucleoSpin® wurde die RNA aus zuvor in 6er-Zellkulturplatten ausgesäten Mikroglia (1 Millionen Zellen/Ansatz) unter Verwendung eines NucleoSpin®RNA II Kits nach Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden die zuvor stimulierten Zellen in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Lyse mit 350 µl RA1-Puffer, sowie 3,5 µl β-Mercaptomethanol (β-ME) vermischt. Das Lysat wurde zur Filtration auf den NucleoSpin® Filter (violett) gegeben und der Filter in einem 2 ml Sammel-Reaktionsgefäß platziert. Anschließend wurde bei 11.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der NucleoSpin® Filter wurde verworfen und zu dem gefilterteten Lysat in dem Sammelgefäß wurden 350 µl 70 %igen Ethanol hinzu pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend wurde die RNA-Säule (blau) in einem neuen 2 ml Sammel-Reaktionsgefäß platziert und die Proben darauf pipettiert und ein weiteres Mal bei 11.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert.

Die RNA-Säulen wurden ohne Berührung der Wände der Sammel-Reaktionsgefäße vorsichtig herausgezogen und in frische 2 ml Sammelgefäße eingesteckt, bevor 350 µl *Membrane Desalting* Puffer (MDB) auf die RNA-Säulen gegeben wurden. Der neue Ansatz wurde dann bei 11.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Im anschließenden Schritt wurden zum DNA-Verdau 95 µl DNase Reaktionslösung (10 µl rDNase + 90 µl Reaktionspuffer) auf die Säulen gegeben und der gesamte Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit 200 µl RAW2-Puffer gespült. Um störende Proteine zu beseitigen und die Proben aufzureinigen, wurde bei 11.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und die Säulen danach in neuen 2 ml Sammelgefäßen platziert. Anschließend wurden 600 µl RA3-Puffer auf die Säulen gegeben und erneut bei 11.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert,

bevor der Durchfluss verworfen wurde. Der letzte Schritt wurde nochmals mit 250 µl RA3-Puffer und einer Zentrifugationszeit von 2 Minuten wiederholt. Zum Eluieren der RNA wurden die Säulen im nächsten Schritt in nukleasefreie Sammel-Reaktionsgefäße überführt und mit 20 µl RNase-freiem *Aqua bidest* gespült. Anschließend wurde bei 11.000 x g für 1 Minute zentrifugiert, um sicher zu stellen, dass die Probe vollständig getrocknet ist. Abschließend folgte eine Messung der so gewonnenen RNA-Mengen, bevor diese bei -70 °C für eine spätere Weiterverarbeitung gelagert wurde.

2.2.7.2 Trizol®

Zu Beginn der Isolierung der mRNA wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die adhärennten Mikroglia zweimal mit PBS gespült. Unter dem Sicherheitsabzug erfolgte anschließend je Ansatz die Zugabe eines Milliliters Trizol®-Reagenz, um die Proben zu lysieren. Unter Zuhilfenahme eines Zellschabers wurden die lysierten Mikroglia vom Boden der Zellkulturplatten abgeschabt, bevor die Lysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt wurden. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol®-Reagenz. Die Ansätze wurden kurz manuell aufgeschüttelt und bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz bei 12.000 x g bei 6-8 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Unter diesem Vorgang bildeten sich zwei Phasen, die von einer dritten Interphase geteilt wurden. Am Grund zeichnete sich eine rote Phenol-Chloroformphase ab, die die DNA und die Proteine enthielt. An der Oberfläche bildete sich eine farblose wässrige Phase mit der RNA. Die RNA enthaltende wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1 µl Glycogen (70 mg/ml) und 500 µl Isopropylalkohol vermischt. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss daran kurz mit 12.000 x g bei 6-8 °C zentrifugiert. Während dieses Vorgangs lagerte sich die RNA als ein gelartiges Pellet am Boden und zum Teil an den unteren Seiten des Reaktionsgefäßes ab. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das am Boden verbliebene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 %igem Ethanol gespült, bevor das RNA-Ethanol-Gemisch für 5 Minuten bei 7.600 x g bei 6-8 °C zentrifugiert wurde. Der dabei entstandene Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen und das Pellet größtenteils luftgetrocknet. Das nicht ganz ausgetrocknete Pellet wurde im sich anschließenden Schritt in 20 µl RNase-freiem *Aqua bidest* gelöst und kurz zentrifugiert. Abschließend erfolgte noch eine Inkubation für 10 Minuten bei 57 °C gefolgt von einer kurzen Zentrifugation. Die so gewonnene RNA wurde bei -70 °C gelagert.

2.2.7.3 Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der extrahierten RNA

Vor der Herstellung von *complementary* DNA (cDNA) wurde zunächst in jeder Probe der RNA-Anteil quantifiziert. Dafür wurden jeweils 2 µl der extrahierten RNA auf eine *Take3™ Multi-Volume* Platte pipettiert und anschließend die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 260 nm im Epoch-Spektroskop gemessen. Durch die gleichzeitige Extinktionsmessung bei einer Referenzwellenlänge von 280 nm konnte aus dem Quotienten (260/280 nm) von RNA und DNA der Reinheitsgrad der RNA ermittelt werden. Dieser sollte für optimale Versuchsbedingungen $\geq 1,7$ sein. Eine Transkription der RNA für die weiteren Versuche erfolgte nur, wenn die extrahierte RNA mindestens dieser Anforderung entsprach.

2.2.8 cDNA-Synthese

Bei der Synthese von cDNA aus mRNA hybridisieren unspezifische Primer mit den Poly-A-Schwänzen der eukaryonten mRNA. Anschließend kommt es an den zuvor gebildeten Primer-RNA-Komplexen zur Anlagerung einer reversen Transkriptase, welche für die Synthese der cDNA auf Grundlage der mRNA zuständig ist.

In dieser Arbeit wurde für die cDNA-Synthese je 1 µg der gewonnenen mRNA mit RNase-freiem *Aqua bideest* auf 8 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Um eventuell in den einzelnen Proben verbliebene Reste der genomischen DNA zu entfernen, wurde zu den Proben jeweils 1 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase (10.000 units) hinzu pipettiert. Zum Verdau der DNA-Reste wurden die Proben danach bei 37 °C für 15 Minuten im *Thermocycler* inkubiert.

Im folgenden Schritt erfolgte die Inaktivierung der DNase, indem zu jedem Ansatz 1 µl Stopplösung (EDTA 25 nM) pipettiert wurde, bevor die Proben für 10 Minuten bei 65 °C im *Thermocycler* inkubiert wurden. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1 µl eines Primer-Gemisches (200 ng Random Hexamer) pipettiert und für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Während dessen wurde ein Transskriptionsmix bestehend aus 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 nM) und 1 µl *Aqua bideest* pro Probe plus eins angefertigt. Davon wurden zu jedem Probenansatz 7 µl pipettiert und die Ansätze bei 25 °C für 5 Minuten im *Thermocycler* inkubiert, bevor jeweils direkt 1 µl Reverse Transskriptase hinzu pipettiert wurde. Abschließend durchliefen die Ansätze mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 20 µl zur Synthese der cDNA und der finalen Hitzeinaktivierung des Enzymes das nachfolgende Programm im *Thermocycler*: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C.

2.2.9 MCR-Nachweis auf Mikroglia

Der Nachweis des MCR in primären Mikroglia erfolgte über eine qualitative PCR. Dafür wurde zunächst mRNA, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, aus den Mikroglia isoliert und diese in eine cDNA transkribiert. Für den Nachweis des MCR in Mikroglia auf mRNA-Ebene wurde dafür ein für diesen Rezeptor typischer Abschnitt der cDNA mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert. Für diesen Versuch diente jeweils ein Ansatz von 1 Million Mikroglia, die wie in Kapitel 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben, ausgesät und stimuliert wurden. Ein Stimulationsansatz wurde mit LPS stimuliert und ein weiterer Ansatz blieb als Kontrolle unstimuliert.

2.2.9.1 Qualitative PCR

Es wurden die im folgenden aufgeführten drei sequenzspezifische Primer-Varianten für den Nachweis des MCR verwendet:

I.) Nr3c2-MCR (Ratte, 152bp)

5'-GAT CCA GGT CGT GAA GTG GG-3' (*forward*)

5'-AGA GGA GTT GGC TGT TCG TG-3' (*reverse*)

II.) Nr3c2-MCR (Ratte, 125bp)

5'-TTC AGT ATG CAG CCC TGT GG-3' (*forward*)

5'-TGT TTT CGA CAC TGG GGG AG-3' (*reverse*)

III.) Nr3c2-MCR (Ratte, 219bp)

5'-AGA AAG GTG CTC ACG ACG TT-3' (*forward*)

5'-CGC CTG AAC ATG AGT GCT TG-3' (*reverse*)

Die Primer wurden mit dem online frei verfügbaren Programm *Origin designt* und nach Herstellerangaben in *Aqua bideest* gelöst und die Arbeitskonzentration 1:10 in *Aqua bideest* verdünnt. Die einzelnen Reaktionsansätze für die folgende PCR setzten sich dabei jeweils aus 5 µl *Dream-Taq*-Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mmol), je 2,5 µl des jeweiligen verdünnten Primerpaares (*forward* und *reverse*), 0,3 µl *Dream-Taq*-Polymerase und 33,7 µl *Aqua bideest* zusammen. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 4 µl der zu untersuchenden 1:20 verdünnten cDNA pipettiert. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit cDNA aus der Rattenniere mitgeführt. Vor dem Start des eigentlichen PCR-Programmes wurden die einzelnen Ansätze für 5 Minuten bei 94 °C im *Thermocycler* vorinkubiert. Erst im nächsten Schritt erfolgte die Amplifikation der Ansätze nach folgendem Programm im *Thermocycler*: Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C, *Annealing* für 45 Sekunden bei 60 °C, Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C.

Um eine ausreichende Menge an Amplifikat zu erhalten, wurde dieses Programm in 35 Zyklen wiederholt und abschließend für 7 Minuten eine finale Extension bei 72 °C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie nachfolgend beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.9.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, zuvor amplifizierte PCR-Produkte in einem elektromagnetischen Feld der Größe nach aufzutrennen und anhand eines Markers definierter Größe nachzuweisen.

Für die Durchführung wurde zunächst ein 56 cm² großes 2 %iges Agarosegel gegossen. Dafür wurden 1,4 g Agarose mit 70 ml TAE-Puffer vermengt und anschließend in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen dieser Lösung auf circa 50 °C, wurden 5 µl des fluoreszierenden Farbstoffes peqGreen dazu pipettiert, die Lösung zwischen zwei Glasplatten in einen Gelgießstand gegossen und umgehend ein Gelkamm für 10 Geltaschen eingebracht. Nach dem Auskühlen und Festwerden des Gels wurde der Kamm wieder entfernt und das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer eingelegt, die zuvor mit TAE-Puffer aufgefüllt wurde. Im nächsten Schritt wurden 50 µl der jeweiligen Proben mit 5 µl Ladepuffer vermengt, und 10 µl dieser Lösung in jede Geltasche pipettiert. Als Größenstandard wurden zusätzlich 5 µl eines DNA-Markers (*DNA-ladder* 100 bp) in eine Tasche des Gels geladen. Bei 120 Volt und 160 mA lief die Elektrophorese dann circa 45 Minuten, bis das Bromphenolblau des DNA-Markers bis kurz vor das Gel-Ende gelaufen war. Danach erfolgte die qualitative Auswertung anhand des mitgeführten DNA-Größenstandards.

2.2.9.3 Qualitative Auswertung der Agarosegelelektrophorese

Die Auswertung des Agarosegels erfolgte im Gel-Dokumentationssystem E.A.S.Y RH unter UV-Licht. Dabei wurde mit der Software EasyWin 32 die UV-Fluoreszenz der Proben mit der der mitgeführten Größenstandards verglichen. Zur Dokumentation wurden die Ergebnisse mit der systemintegrierten Digitalkamera festgehalten.

2.2.10 Relative qPCR mit dem TaqMan®-System

Die qPCR beruht darauf, dass die Synthese der PCR-Produkte zu jeder Zeit gemessen werden kann und in der exponentiellen Phase der Amplifikation eine Quantifizierung dieser PCR-Produkte erfolgen kann. Dafür wird die Expression eines Zielgenes mit der eines nichtregulierten Housekeeping Genes normalisiert und die relative Expression des Zielgenes auf eine Kontrollprobe bezogen ($\Delta\Delta C_t$ -Methode).

Für diese Arbeit wurden je Ansatz 1 Million Mikroglia in 12er-Zellkulturplatten ausgesät (Kapitel 2.2.2), stimuliert (Kapitel 2.2.3), die RNA isoliert (Kapitel 2.2.7) und cDNA synthetisiert (Kapitel 2.2.8). Zur Durchführung der relativen qPCRs wurden gebrauchsfertige TaqMan® Assays on Demand verwendet, die den Vorteil haben, die zu untersuchenden Primer und Fluoreszenzsonden gemeinsam zu enthalten. In Bezug auf eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Aldosteron auf Mikroglia wurde die Regulation folgender pro-inflammatorischer Mediatoren untersucht: iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α und COX-2. Als endogene Kontrolle und Housekeeping Gen diente dabei 18s RNA. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die allein mit 5 ng/ml LPS stimulierte Probe bezogen, die prozentuale Expression berechnet und grafisch dargestellt, wobei LPS als Referenzwert gleich 100 % gesetzt wurde.

Ein jeweiliger qPCR-Reaktionsansatz bestand aus 10 μ l TaqMan®-Puffer, 1 μ l Assay on Demand, 5 μ l Aqua bidest, und 4 μ l der 1:20 verdünnten cDNA (2,5 ng/ml). Die Expression der Ziel- und Housekeepinggene wurde in Doppelansätzen untersucht. Dabei erfolgte die Amplifikation der cDNA mit dem Gerät ABI Prism 7500 fast nach dem nachfolgenden Programm: Vorinkubation für 20 Sekunden bei 50 °C, DNA TaqMan®-Polymerase Aktivierung für 10 Minuten bei 95 °C, Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C, und Annealing/Extension für 1 Minute bei 60 °C.

Die abschließende Auswertung der in den einzelnen qPCR gewonnenen Ergebnisse erfolgte daraufhin am Computer mit dem Programm ABI-Prism 7500 fast.

Sequenzen der Assays on Demand:

18s RNA	5'-TCC ATT GGA GGG CAA GTC TGG TGC C-3'
iNOS	5'-TGC TAT TCC CAG CCC AAC AAC ACA G-3'
IL-1 β	5'-ATA AGC CAA CAA GTG GTA TTC TCC A-3'
IL-6	5'-GAG AAA AGA GTT GTG CAA TGG CAA T-3'
TNF- α	5'-CTC ACA CTC AGA TCA TCT TCT CAA A-3'
COX-2	5'-CTC AGC CAT GCA GCA AAT CCT TGC T-3'

2.2.11 IL-6 und TNF- α Sandwich-ELISA

Ein möglicher Einfluss von Aldosteron auf die Synthese und Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α wurde in dieser Arbeit mittels eines IL-6- und eines TNF- α -Sandwich-ELISAs in den Zellkulturüberständen untersucht. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Nachweis bestimmter Moleküle auf Proteinebene.

Für die Proteinquantifizierung von IL-6 und TNF- α wurden die ELISAs nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden über Nacht 100 μ l des *Capture*-Antikörpers (Anti-*rat* IL-6 bzw. Anti-*rat* TNF- α) in einer Verdünnung von 1:125 in PBS auf einer 96er-ELISA-Platte aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Spülvorgang der Vertiefungen mit je 200 μ l ELISA-Waschpuffer, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden in die einzelnen Vertiefungen je 200 μ l *Assay-Diluent*, bestehend aus PBS mit 10 % FKS, pipettiert und die Platte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wodurch unspezifische Bindungsstellen geblockt wurden. Anschließend wurde das *Assay-Diluent* in einem weiteren Spülvorgang entfernt. Im nächsten Schritt wurden je 100 μ l des zu untersuchenden Zellkulturüberstandes in einer Verdünnung von 1:50 als Dreifachbestimmung in die Vertiefungen pipettiert. Zusätzlich wurden je 100 μ l Standard als Dreifachbestimmung in unterschiedlichen seriellen Verdünnungsreihen (IL-6: 5000 pg/ml bis 75 pg/ml, TNF- α : 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml) mitgeführt. Die Platten wurden abgeklebt und entweder bei 37 °C (IL-6-ELISA) oder bei Raumtemperatur (TNF- α -ELISA) für zwei Stunden inkubiert. Es wurde erneut gespült und 100 μ l des *Detection*-Antikörpers (Biotinylated Anti-*rat* IL-6 bzw. Biotinylated Anti-*rat* TNF- α), in einer Verdünnung von 1:250, in die einzelnen Vertiefungen pipettiert. Es folgte die Inkubation der Ansätze für 60 Minuten bei 37 °C (IL-6 ELISA) bzw. Raumtemperatur (TNF- α -ELISA) mit abgeklebter Platte, sowie drei nachfolgende Spülvorgänge mit je 200 μ l ELISA-Waschpuffer, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 100 μ l des Enzym-Reagents SA_v-HRP in einer Verdünnung von 1:250 hinzugegeben und die Ansätze bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach einem letzten Spülvorgang mit je 200 μ l ELISA-Waschpuffer wurden im nächsten Schritt in die Vertiefungen je 100 μ l eines kurz vorher angesetzten Tetramethylbenzidin-Peroxidase-Substrats (TMB) pipettiert und die abgeklebten Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Vor der abschließenden Auswertung wurden 50 μ l einer 2 M Schwefelsäure als Stopplösung zugegeben, um den Entwicklungsprozess zu beenden. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von blau auf gelb, der abschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 592 nm) gemessen wurde. Dabei dienten die eingesetzten Standards als Berechnungsgrundlage der Ergebnisse.

2.2.12 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zum spezifischen Proteinnachweis unter Zuhilfenahme von Antikörpern. Dabei werden die nachzuweisenden Proteine zunächst in einem elektrischen Feld gelelektrophoretisch nach ihrer Ladung und Größe aufgetrennt, bevor sie auf eine Trägermembran übertragen (*Blotting*) werden. Für den Prozess des *Blottings* werden die Proteine in einem elektrischen Feld, das senkrecht zum Gel steht, auf eine Membran übertragen. Das durch vorangegangene Auftrennung entstandene Proteinmuster bleibt dabei erhalten und die gesuchten Proteine können mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

In dieser Arbeit dienten die Western Blot Analysen der Untersuchung von mikroglialen Signaltransduktionswegen.

2.2.12.1 Zellablösung und Proteinisolierung

Vor der Proteinisolierung für den Western Blot wurden die Ansätze zweimal mit eiskühlem PBS gespült. Danach erfolgte die Ablösung mit gleichzeitiger Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer und dem Einsatz eines Zellschabers. Die lysierten Mikroglia wurden anschließend in 1 ml Reaktionsgefäße überführt und die so isolierten Gesamtproteine durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert.

2.2.12.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch mit dem BCA™-Kit. Dafür wurden jeweils 10 µl der zu bestimmenden Probe und 10 µl eines Leerwertes, in eine 96er-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl Reaktionsreagenz, bestehend aus 50 Volumeneinheiten der Lösung A des BCA™-Kits und einer Volumeneinheit der Lösung B des BCA™-Kits, hinzu pipettiert. Abschließend erfolgte bei einer Wellenlänge von 540 nm die Bestimmung der Extinktion im Photometer zur Berechnung des Proteingehalts.

2.2.12.3 Vorbereitung der Proben für das Gel

Zur Vorbereitung der Proben für das Gel wurden 10 µg der zu untersuchenden Proteine mit 40 µl Probenpuffer verdünnt und die Proteine in einem Eppendorf-Thermomixer bei 99 °C für 5 Minuten denaturiert. Danach war eine Lagerung der isolierten Gesamtproteine bei -18 °C oder eine direkte Weiterverwendung in der Gel-Elektrophorese möglich.

2.2.12.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Diese Form der Elektrophorese dient zum Auftrennen von Proteinen anhand der unterschiedlichen Molekulargewichte in einem elektrischen Feld. Damit es dabei nicht zur Bildung eines Stromfeldes kommt, werden die unterschiedlich geladenen Proteine zunächst

mit Natriumduodecylsulfat (SDS) behandelt, und so alle Proteine negativ geladen.

Vor der Gelelektrophorese wurde ein Trenngel (12,5 %) zwischen zwei fettfreien Glasplatten gegossen und mit Propanolol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Propanolol entfernt und in einem weiteren Schritt das Sammelgel (4,5 %) auf das ausgehärtete Trenngel gegossen. Im Anschluss daran wurde in das noch flüssige Sammelgel zur Bildung der Geltaschen ein Kamm eingesteckt und dieser nach vollständiger Aushärtung des Sammelgels wieder entfernt. Abschließend wurde das fertige Gel in die Laufkammer eingesetzt und die Elektrophoresekammer vorsichtig bis zum oberen Rand mit Laufpuffer befüllt, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern.

Vor dem Beschicken der einzelnen Taschen mit dem Proteingemisch, wurden die Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und damit denaturiert sowie alle aufzutrennenden Proteine negativ geladen. Erst danach wurden 20 µl jeder zu untersuchenden Probe in eine eigene Geltasche pipettiert. Parallel dazu wurden 5 µl eines Proteinstandards als Marker in eine weitere Tasche pipettiert. Der Deckel wurde aufgesetzt und das Laufprogramm gestartet. Für zwei Gele wurden 200 V und 125 mA über einen Zeitraum von etwa 35 Minuten angelegt.

In der Zwischenzeit wurde eine PVDF-Membran für den sich anschließenden Proteintransfer vorbereitet. Dafür wurde die Membran für circa 60 Sekunden in Methanol aktiviert und für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht. Zusätzlich wurden für das Blotten die Whatman-Pappen in Transferpuffer eingeweicht.

Nach Abschluss des Laufprogrammes folgte das Auflegen von zwei mit Transferpuffer angefeuchteten Whatman-Pappen in die Blotterkammer. Darauf wurde eine aktivierte PVDF-Membran gelegt, bevor das Gel vorsichtig von den Glasscheiben getrennt und auf diese Membran gelegt wurde. Mit zwei weiteren angefeuchteten Whatman-Pappen wurde das Gel zudem von oben bedeckt. Nachfolgend erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran. Dazu diente ein Laufprogramm bei dem für ein Gel 25 V und 1 A für etwa 30 Minuten angelegt wurden.

Nach Abschluss des Blottens wurde die PVDF-Membran unter ständiger Bewegung in einer Tris-gepufferten Saline Tween-Lösung (TBS-T) mit 2 % Kasein für 60 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Währenddessen wurde der Primärantikörper Phospho-p38 (1:1.000 in 2 % Kasein in TBS-T) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt, die Membran eingesteckt und bei 4 °C über Nacht auf einem Rollmischer inkubiert.

Am Folgetag erfolgte zunächst ein dreimaliger Spülvorgang der Membran mit TBS-T-Lösung für jeweils 15 Minuten. Im Anschluss daran wurde ein *horse-radish-peroxidase* gekoppelter

Sekundärantikörper aus der Ziege (*goat anti-rabbit* IgG-HRP: sc-2004, 1:10.000 in 2 % Kasein in TBS-T) auf die Membran pipettiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreifach mit TBS-T für 15 Minuten gespült.

Die Bandendetektion erfolgte mittels ECL-Kit nach Herstellerangaben. Hierzu wurde die Substratlösung im Verhältnis 1:2 (je 100 µl Lösung-A und -B) gemischt und auf die Membran pipettiert. Die sich anschließende Detektion erfolgte mit dem Chemilumineszenzgerät Fusion SL.

Zur Detektion der unphosphorylierten p38-MAPK auf der selben Membran wurde diese zunächst für 10 Minuten mit 0,2 M NaOH behandelt und damit sämtliche zuvor gebundene Antikörper gestrippt. Anschließend wurde die Membran in 2 %iger Kasein-in-TBS-T-Lösung geblockt und daraufhin der Primärantikörper p38 (1:1.000 in 2 % Kasein in TBS-T) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt, die Membran eingesteckt und bei 4 °C über Nacht auf einem Rollmischer inkubiert. Abschließend wurden die Banden, wie zuvor beschrieben, durch eine Enzym-Substrat-spezifische Reaktion unter der Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers aus der Ziege (*goat anti-rabbit* IgG-HRP: sc-2004, 1:10.000 in 2 % Kasein in TBS-T) und eines ECL-Kits sichtbar gemacht.

Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Fusion. Zur Berechnung der Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK wurde das Programm Microsoft® Excel verwendet.

2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung von NFκB

Zur Beurteilung eines weiteren intrazellulären Signalweges wurden außerdem Immunfluoreszenzfärbungen der einzelnen Stimulationen angefertigt. Die nach der Aussaat auf Deckgläsern adhären und für 3 Stunden stimulierten Mikroglia wurden zunächst mit PBS gespült, um mögliche Rückstände des Stimulationsmediums zu entfernen. Danach erfolgte eine Fixierung der Mikroglia für 10 Minuten in eiskaltem Azeton, sowie ein weiterer dreimaliger Spülvorgang zur Entfernung von Azeton-Rückständen. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (anti-NFκB p65) in einer Verdünnung von jeweils 1:50 für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Spülvorgang, um Antikörper-Überschüsse zu entfernen. Die Detektion des gebundenen NFκB-Antikörpers erfolgte durch eine 60 minütige Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor A31628) gekoppelten Sekundärantikörper (*a-rabbit*) in einer Verdünnung von 1:700 bei Raumtemperatur. Sekundärantikörper-Überschüsse wurden durch dreimaliges Spülen mittels PBS entfernt. Im Anschluss daran erfolgte die Kernfärbung mit Bisbenzimid, 1:1

gelöst in PBS, bei der die Zellen für 10 Minuten mit dem blau fluoreszierenden DNA-interkallierenden Farbstoff inkubiert wurden. Es folgte ein letzter Spülvorgang mit PBS. Vor der abschließenden luftblasenfreien Eindeckung der Zellen auf Objektträgern mit dem Eindeckmedium Immu-Mount wurden die Zellen noch einmal mit *Aqua bidest* gespült, um Salze von dem PBS zu entfernen.

Nach dem Trocknen des Eindeckmediums wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M mit integrierter Axiocam mikroskopiert und fotografiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden dabei mit einer Wellenlänge von 461 nm (DAPI) angeregt und fluoreszierten blau oder mit 519 nm (AlexaFluor 488) angeregt und fluoreszierten grün.

2.2.14 Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse

Die graphischen Abbildungen dieser Arbeit wurden mit der Software GraphPad Prism 5 der Firma Graphpad Software aus San Francisco, USA, erstellt. Dabei wurden die jeweiligen Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One-Way* ANOVA) und ein post-hoc Test nach Bonferoni dienten der statistischen Analyse, die ebenfalls mit der Software Graphpad Prism 5 durchgeführt wurde. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgten mit dem Programm AxioVision LE™ der Firma Carl Zeiss Micro Imaging GmbH aus Jena.

2.2.15 Anfertigung und Gestaltung

Die Erstellung dieser Inauguraldissertation erfolgte mit der Software Microsoft® Word für Mac 2011. Die Modifikation und Erstellung weiterer Abbildungen erfolgte mittels Adobe Photoshop CC™ des Unternehmens Adobe Systems Incorporated.

3. Ergebnisse

Die nachfolgenden Kapitel zeigen die Ergebnisse der für diese Arbeit durchgeführten Versuche. Dabei werden zunächst die Ergebnisse zur Fragestellung, der Wirkung von Aldosteron auf Mikroglia, aufgeführt, bevor abschließend die Ergebnisse zum Vergleich der Methoden zur RNA-Isolierung folgen. Als Grundlage diente dabei eine Aldosteron-Konzentration von 200 nm, da sich diese in einer anderen Studie (42) sowie in Vorversuchen zu dieser Arbeit als geeignet erwies.

Grundsätzlich wurden dabei alle Versuchsansätze, die Aldosteron enthielten, vor Beginn der eigentlichen Versuchszeit für 30 Minuten mit Aldosteron vorinkubiert.

3.1 MTT-Test

Zu Beginn wurde überprüft, ob Aldosteron (200 nm) keinen toxischen Effekt auf Mikroglia ausübt. Eine Toxizität hätte Aldosteron bereits im Vorfeld als möglichen anti-inflammatorischen Mediator disqualifiziert.

Die Ergebnisse des MTT-Testes zeigten, dass Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (100 %) keinen toxischen Effekt auf Mikroglia ausübt. Es konnte lediglich ein leichter Rückgang des Zellüberlebens auf 86,08 % beobachtet werden. Dahingegen führte eine Einzelstimulation mit LPS zu einem Anstieg der vitalen Zellen auf 127,83 % und eine kombinierte Stimulation mit Aldosteron und LPS auf 124,31 % (Abb. 3.1).

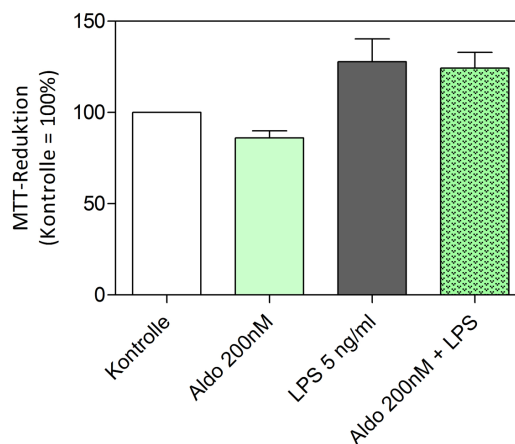


Abb. 3.1: Toxizitätsprüfung von 200 nm Aldosteron auf Mikroglia. Im Vergleich zur Kontrolle (100 %) zeigte die Stimulation mit LPS einen Anstieg auf 127,83 %. Die Einzelstimulation mit Aldosteron führte in Bezug auf die Kontrolle zu keiner Toxizität. Im Mittel ergab sich für die Aldosteron-Proben ein Wert von 86,01 %. Bei der Kombinationsstimulation mit LPS und Aldosteron konnte ein Relativwert von 124,31 % ermittelt werden (n = 3).

3.2 Morphologische Mikroglia-Zellkulturstudien

Vor Beginn der weiteren Versuche mit Aldosteron wurden Zellkulturstudien durchgeführt, die dazu dienten die Morphologie der Mikroglia in Anwesenheit von LPS und Aldosteron zu untersuchen. Dafür wurden mehrere unabhängige Ansätze zur Auswertung nach 24 Stunden mit Coomassie Blau gefärbt und mikroskopisch beurteilt.

3.2.1 Einfluss von Aldosteron auf die Morphologie von Mikroglia

Mikroglia in reinem Medium zur Zellkultivierung liegen in ihrer Ruheform als ramifizierte Zellen vor, die durch einen flachen Zelleib und eine Vielzahl an pseudopodenartigen Zellfortsätzen gekennzeichnet sind (32).

Im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Zellkulturstudien zeigten die morphologischen Untersuchungen der unstimulierten Mikroglia (Kontrolle), dass diese nach circa 24 Stunden ihre ramifizierte Ruheform annehmen (Abb. 3.2/A).

Zudem wurde überprüft, ob Aldosteron allein einen lichtmikroskopisch erkennbaren Einfluss auf die Morphologie der Mikroglia besitzt. Abbildung 3.2/B zeigt, dass Aldosteron zu keinen mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der mikroglialen Zellform führt. Die Zellen liegen weiterhin in einer ruhenden, ramifizierten Form vor.

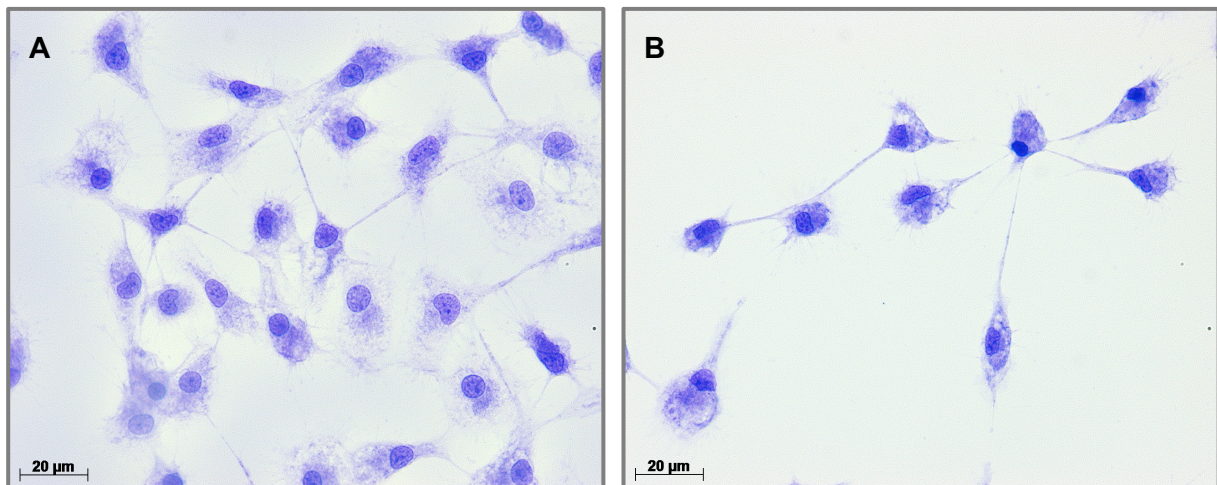


Abb. 3.2: Primäre Mikroglia in Ruheform. A, ruhende Mikroglia (Kontrolle): Mikroglia liegen nach 24 Stunden Ruhe in der Kontrolle nur in ramifizierte Form vor. **B, ruhende Mikroglia (Aldosteron):** Die Behandlung von Mikroglia mit Aldosteron führt zu keinem Übergang der Mikroglia in eine amöboide Form (n = 3).

3.2.2 Einfluss von Aldosteron auf die Morphologie LPS-aktivierter Mikroglia

Ein Übergang der ramifizierten, ruhenden Form in eine amöboide, aktive Form der Mikroglia ist ein erstes Indiz für eine Aktivierung der Zellen. Nach einem Kontakt zu einem pro-inflammatorischen Stoff oder Pathogen kommt es zu dieser Metamorphose, bei der die Mikroglia ihre Pseudopodien einziehen und ihren flachen Zelleib zu einem rundlichen Körper umformen (10, 13).

Zur Überprüfung ob eine Stimulation mittels 5 ng/ml LPS zu einer Aktivierung der ruhenden Mikroglia führt, wurde LPS in der genannten Konzentration zu ruhenden primären Mikroglia hinzugegeben. Mikroskopisch zeigte sich, dass die Zellkulturen nach 24 Stunden überwiegend eine amöboide und somit aktivierte Form aufwiesen (Abb. 3.3/A). Zudem wurde mittels der Mikroskopie überprüft, ob die Zugabe von Aldosteron, in LPS-stimulierten Mikroglia kulturen, bereits eine Reduktion der amöboiden Form bewirkt und damit einen ersten Hinweis für eine anti-inflammatorische Wirkung des Aldosteron auf Mikroglia aufzeigt. Die Betrachtung der unterschiedlichen Aktivierungsformen unter dem Mikroskop zeigte, dass es durch Aldosteron zu einem solchen Effekt kommt. In der mit Aldosteron und LPS behandelten Kultur ist im Vergleich zur nur mit LPS stimulierten Kultur eine geringere LPS-Wirkung erkennbar (Abb. 3.3/B), was sich dadurch zeigt, dass die Mikroglia überwiegend in einer ramifizierten Form vorliegen.

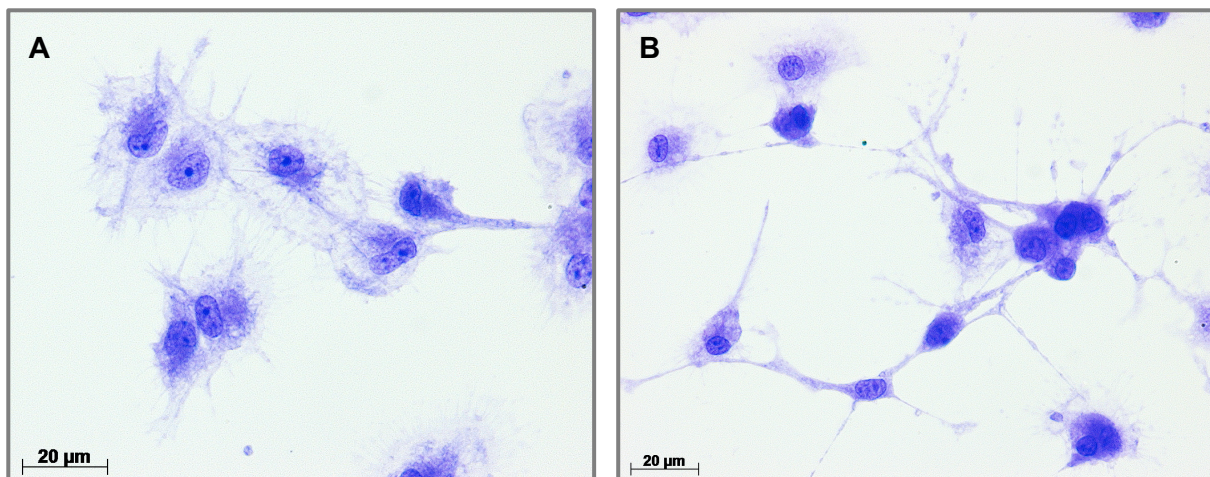


Abb. 3.3: Aktivierungsgrade primärer Mikroglia im Vergleich. Die Grafiken zeigen, in wie weit Aldosteron zuvor mittels LPS aktivierte Mikroglia beeinflusst. **A, aktivierte Mikroglia (LPS):** Mikroglia liegen nach einer Behandlung mit LPS nach 24 Stunden überwiegend in amöboider, aktivierter Form vor. **B, aktivierte/ruhende Mikroglia (Aldosteron + LPS):** Die Behandlung von LPS-stimulierten Mikroglia mit Aldosteron führt zu einer geringeren LPS-Wirkung der Mikroglia, was sich dadurch darstellt, dass die Mikroglia vermehrt in einer ramifizierten, ruhende Form verbleiben (n = 3).

3.3 Nachweis des MCRs in Mikroglia

Damit Aldosteron seine Wirkung direkt an einer Zelle entfalten kann bedarf es des MCRs. Aus der Literatur geht hervor, dass der MCR auch in Mikroglia vorkommen kann (38). Zum Nachweis des MCR in den für diese Arbeit kultivierten Mikroglia wurde eine PCR mit sich anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Als Positivkontrolle diente dabei cDNA aus Rattennieren, da diese einen hohen Anteil an MCR besitzen (36).

Die Abbildung 3.4 zeigt, dass sowohl unstimulierte als auch mit LPS stimulierte Mikroglia für alle drei untersuchten MCR-Primerpaare ein Signal zeigen (Bahn 2,5 und 8: Primer 1 bei 152 bp; Bahn 3, 6 und 9: Primer 2 bei 125 bp; Bahn 1, 4 und 7: Primer 3 bei 219 bp). Dabei ist die Intensität des Signals bei den unstimulierten Mikroglia und der Positivkontrolle (Niere) relativ gleich stark, wohingegen die mit LPS stimulierten und somit aktivierten Mikroglia eine niedrigere Signalintensität aufzeigen.

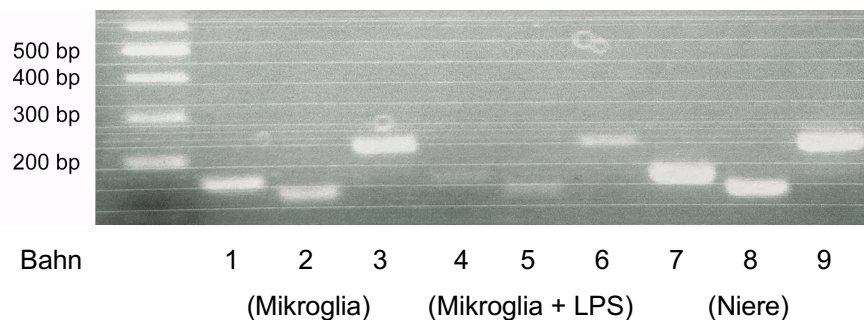


Abb. 3.4: Nachweis des MCRs in Mikroglia. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufnahme einer Agarosegelelektrophorese nach durchlaufener PCR mit 3 verschiedenen, für den MCR spezifischen Primerpaaren, wobei für alle Primer eindeutige Banden mit spezifischer Größe detektiert werden konnten. Bahn 2,5 und 8: Primer 1: 152 bp; Bahn 3, 6 und 9: Primer 2: 125 bp; Bahn 1, 4 und 7: Primer 3: 219 bp. Als Positivkontrolle diente DNA aus Rattennieren. Es zeigt sich, dass unstimulierte Mikroglia im Vergleich zu mit LPS stimulierten Mikroglia eine höhere Signalintensität aufzeigen.

3.4 Reduktion der NO-Synthese durch Aldosteron in LPS stimulierten Mikroglia

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Aldosteron einen modulatorischen Effekt auf die Synthese und Freisetzung von NO besitzt. Dazu wurde zunächst die NO-Freisetzung aus Mikroglia in den Zellkulturüberständen gemessen und nachfolgend die mRNA-Expressionsrate der iNOS in den einzelnen Proben bestimmt.

3.4.1 Reduktion der NO-Freisetzung durch Aldosteron

Die NO-Freisetzung wurde indirekt mittels Griess-Reagenz im Überstand der Mikrogliazellkulturen bestimmt.

In Bezug auf die unstimulierte Kontrolle führte eine Stimulation mit LPS allein zu einem signifikanten Anstieg der NO-Freisetzung. Dieses wurde in dieser Arbeit als eine Aktivierung der Mikroglia gedeutet und diente für die Auswertung als Referenzwert (100 %). Eine Einzelstimulation mit Aldosteron hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt auf die Freisetzung von NO. Ein Einfluss auf die NO-Freisetzung durch Aldosteron wurde erst sichtbar, als LPS-stimulierte Mikroglia mit Aldosteron behandelt wurden. Dabei kam es zu einer signifikanten bzw. höchst signifikanten Reduktion der NO-Freisetzung auf 86,50 % nach 6 Stunden (Abb. 3.5/A) und auf 63,98 % nach 24 Stunden (Abb. 3.5/B).

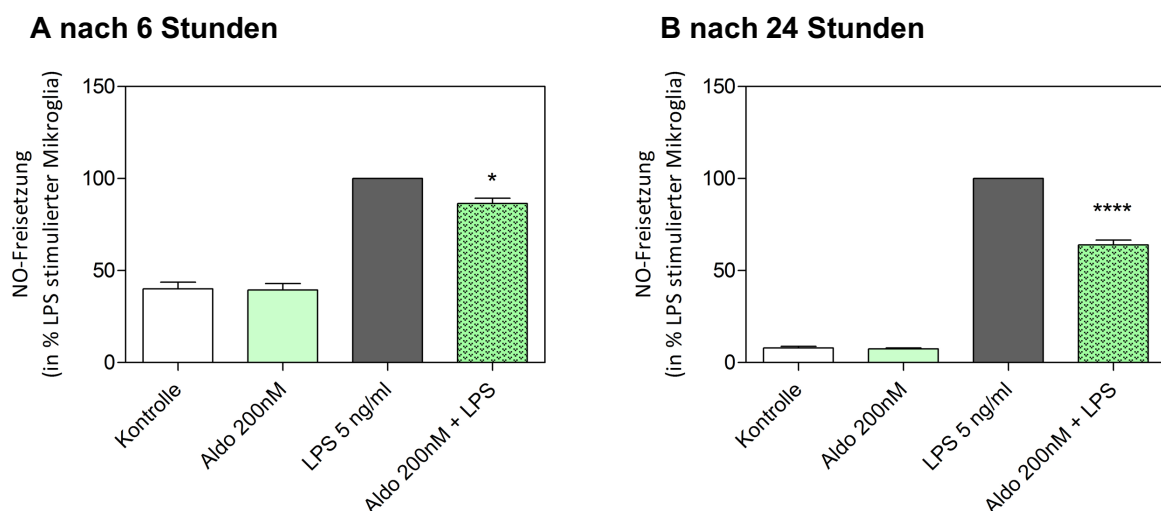


Abb. 3.5: NO-Freisetzung nach 6 und 24 Stunden. Das in den Zellkulturüberständen gemessene NO zeigte die NO-Freisetzung nach den jeweiligen Stimulationen an. Die Werte der reinen LPS-Stimulation dienten dabei als Referenz und wurden gleich 100 % gesetzt. Eine Einzelstimulation mit Aldosteron übte keinen relevanten Effekt aus. **A:** Nach 6 Stunden Aldosteron-Stimulation der durch LPS aktivierten Mikroglia war eine signifikante Reduktion der NO-Freisetzung zu erkennen. **B:** Die Stimulationen der mit LPS versetzten Mikroglia, mittels Aldosteron für 24 Stunden zeigten eine hoch signifikante Reduktion der NO-Freisetzung ($p^* \leq 0.05$; $p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 4$).

3.4.2 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von iNOS durch Aldosteron

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der reduzierten NO-Freisetzung nach einer Stimulation mit Aldosteron und der mRNA-Expression von iNOS nach Aldosteron-Stimulation für 6 bzw. 24 Stunden wurde die Expressionsrate der iNOS-mRNA mittels qPCR (Kapitel 2.2.10) untersucht.

Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS führte zu einem Anstieg der iNOS-mRNA-Synthese in Bezug zu den unstimulierten Kontrollzellen, was in dieser Arbeit als eine Aktivierung der Mikroglia gewertet wurde und für die Auswertung als Referenzwert (100 %) diente. In der Einzelstimulation mit Aldosteron konnten keinerlei Effekte auf die mRNA-Synthese von iNOS beobachtet werden, jedoch wies die kombinierte Stimulation mit LPS und Aldosteron eine hoch signifikante Reduktion der iNOS-mRNA-Synthese nach 6 Stunden auf 61,53 % (Abb. 3.6/A) und nach 24 Stunden auf 10,5 % (Abb. 3.6/B) auf.

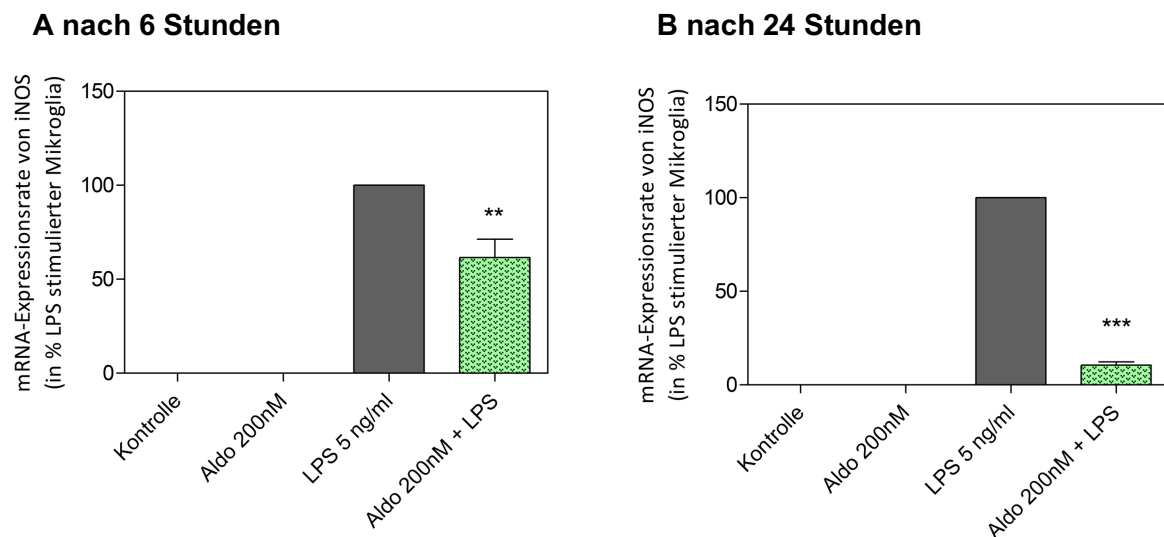


Abb. 3.6: iNOS-mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden. Die mittels qPCR ermittelte iNOS-mRNA diente in den jeweiligen Stimulationen der Untersuchung einer möglichen mikroglialen Aktivierung. Die Werte der reinen LPS-Stimulation dienten dabei als Referenz und sind als 100 % zu betrachten. Eine Stimulation mit Aldosteron allein zeigte keinen erkennbaren Effekt auf die Expressionsrate. **A:** Nach einer 6-stündigen Stimulation der durch LPS aktivierten Mikroglia mit Aldosteron war eine signifikante Reduktion der mRNA-Synthese von iNOS nachzuweisen. **B:** Eine Stimulation der LPS-aktivierten Mikroglia mit Aldosteron für 24 Stunden wies eine hoch signifikante Reduktion der mRNA-Expression von iNOS auf ($p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$; $n = 4$).

3.5 Aldosteroneinfluss auf die mRNA-Synthese pro-inflammatorischer Zytokine und Enzyme in LPS stimulierten Mikroglia mittels qPCR

Der Einfluss von Aldosteron auf die mRNA-Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β und des pro-inflammatorischen Enzymes COX-2 in Mikroglia wurde mittels qPCR (Kapitel 2.2.10) nach 6 und 24 Stunden untersucht.

3.5.1 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von TNF- α durch Aldosteron

Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS führte zu einem Anstieg der TNF- α -mRNA-Synthese im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. In der Einzelstimulation mit Aldosteron konnten keinerlei Effekte auf die mRNA-Synthese von TNF- α beobachtet werden, jedoch wies die kombinierte Stimulation mit LPS und Aldosteron eine signifikante bzw. höchst signifikante Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese auf einen Wert von 87,92 % nach 6-stündiger Stimulation (Abb. 3.7/A) und auf einen Wert von 57,45 % nach 24-stündiger Stimulation (Abb. 3.7/B) auf.

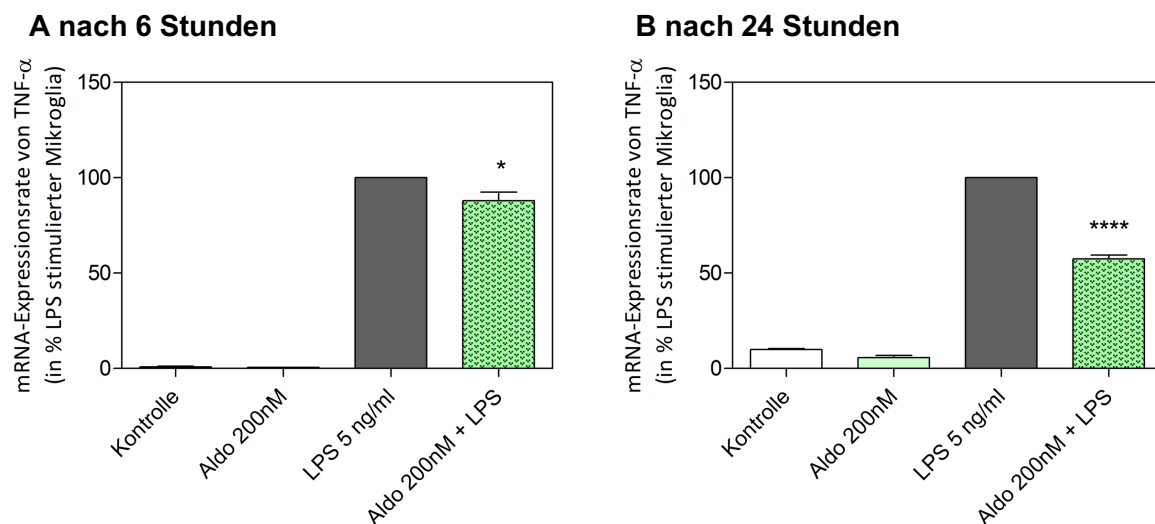


Abb. 3.7: TNF- α -mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden. Die mittels qPCR ermittelte TNF- α -mRNA-Menge diente in den jeweiligen Stimulationen dem Nachweis einer möglichen mikroglialen Aktivierung. Die Werte der reinen LPS-Stimulation dienten dabei als Referenz (100 %). Eine Stimulation mit Aldosteron allein hatte keine signifikanten Auswirkungen. **A:** Nach 6-stündiger Stimulation mit Aldosteron, der mit LPS aktivierten Mikroglia, zeigte sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von TNF- α . **B:** Nach 24-stündiger Stimulation mit Aldosteron war eine hoch signifikante Reduktion der mRNA-Expression von TNF- α zu erkennen ($p^* \leq 0,05$; $p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.5.2 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-6 durch Aldosteron

Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS führte zu einem Anstieg der IL-6-mRNA-Synthese in Bezug zu den unstimulierten Kontrollzellen. Die Einzelstimulationen mit Aldosteron konnten keinerlei Effekte auf die mRNA-Synthese von IL-6 zeigen, allerdings wies die kombinierte Stimulation mit LPS und Aldosteron eine höchst signifikante Reduktion der IL-6-mRNA-Synthese nach 6-stündiger Stimulation auf 33,73 % (Abb. 3.8/A) und nach 24-stündiger Stimulation auf 12,35 %. (Abb. 3.8/B) auf.

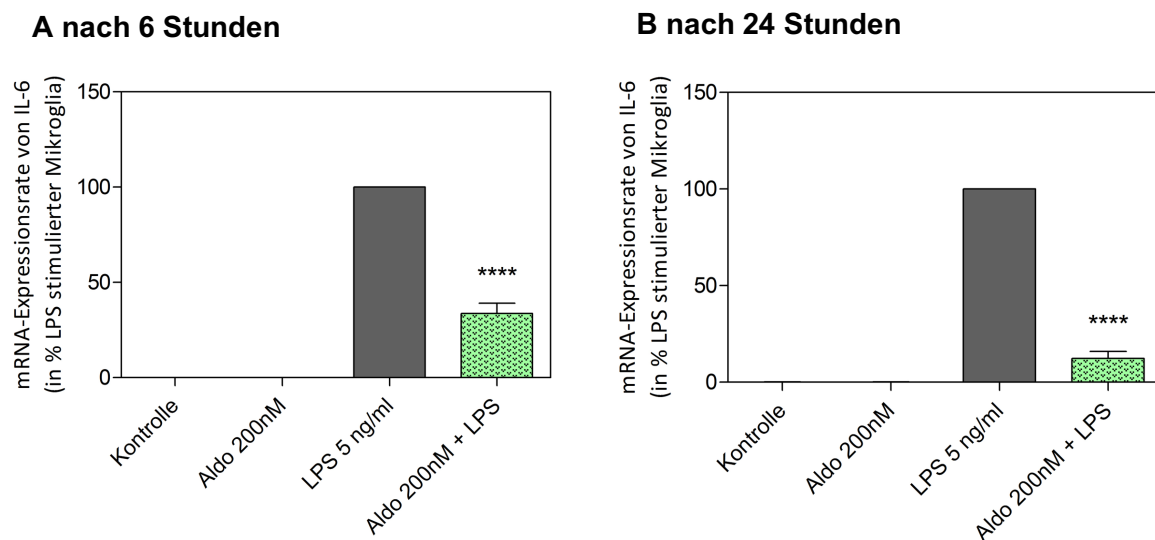


Abb. 3.8: IL-6-mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden. Die mittels qPCR ermittelte IL-6-mRNA-Menge diente in den jeweiligen Stimulationen dem Nachweis einer möglichen Aktivierung von Mikroglia. Die Stimulation mit Aldosteron allein zeigte keine Auswirkung auf. Als Referenzwert (100 %) für den Vergleich mit der Ko-Stimulation mit LPS und Aldosteron diente eine Einzelstimulation mit LPS. **A:** Nach 6 Stunden der Ko-Stimulation mit LPS und Aldosteron konnte eine hoch signifikante Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-6 nachgewiesen werden. **B:** Nach 24-stündiger Ko-Stimulation durch LPS und Aldosteron zeigte sich eine statistisch hoch signifikante Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-6 ($p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.5.3 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β durch Aldosteron

Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS führte in Bezug zu den unstimulierten Kontrollzellen zu einem Anstieg der IL-1 β -mRNA-Synthese. Die Einzelstimulation mit Aldosteron konnte keine Effekte auf die mRNA-Synthese von IL-1 β zeigen, jedoch wies die Ko-Stimulation mit LPS und Aldosteron eine höchst signifikante Reduktion der IL-1 β -mRNA-Synthese nach einer Stimulationszeit von 6 Stunden auf 54,29 % (Abb. 3.9/A) und nach 24 Stunden auf 27,67 % (Abb. 3.9/B) auf.

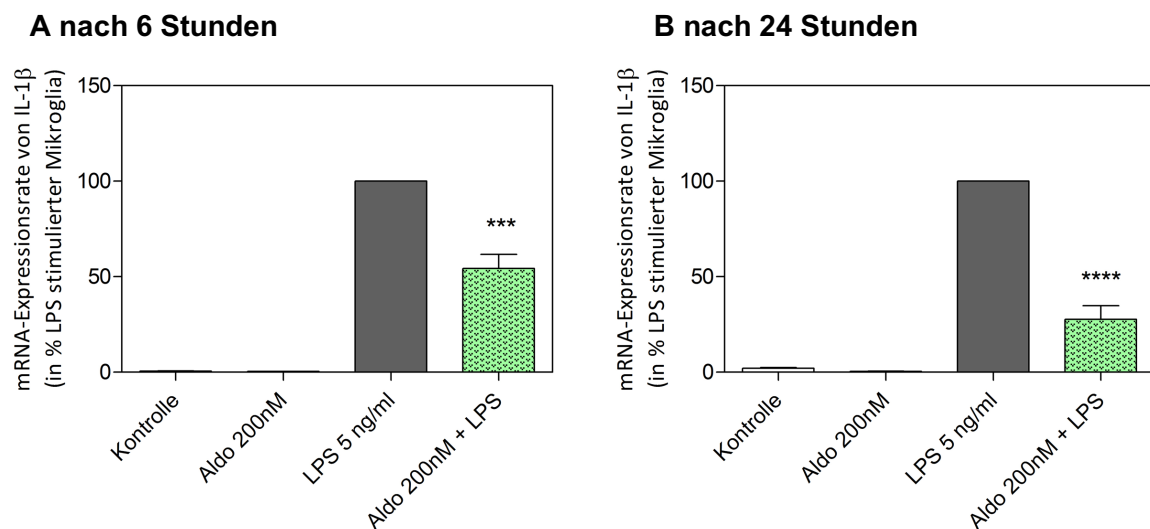


Abb. 3.9: IL-1 β -mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden. Die mittels qPCR ermittelte mRNA-Expressionsrate von IL-1 β diente jeweils in den einzelnen Stimulationen dem Nachweis einer möglichen mikroglialen Aktivierung. Bei der Einzelstimulation mit Aldosteron ließen sich dabei keine erkennbaren Auswirkungen nachweisen. Als Referenzwert (100 %) für die Auswertung diente eine Einzelstimulation der Zellen mit LPS. **A:** Die Behandlung der mittels LPS aktivierten Mikroglia zeigte nach einer Stimulationszeit von 6 Stunden eine statistisch hoch signifikante Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β auf. **B:** Nach 24 Stunden der Stimulation mit Aldosteron, von mit LPS aktivierten Mikroglia, ließ sich eine hoch signifikante Reduktion der mRNA-Syntheserate von IL-1 β beobachten ($p^{***} \leq 0,001$; $p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.5.4 Reduktion der mRNA-Expressionsrate von COX-2 durch Aldosteron

Bei der Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS in Bezug zu unstimulierten Kontrollzellen zeigte sich wie bei den vorherigen Zytokinfunden ebenfalls ein Anstieg der COX-2-mRNA-Synthese. Zudem zeigte die Einzelstimulationen mit Aldosteron keinerlei Effekt auf die mRNA-Synthese von COX-2. Jedoch wies die kombinierte Stimulation mit LPS und Aldosteron wie in den vorherigen Versuchen eine höchst signifikante Reduktion der COX-2-mRNA-Synthese auf einen Wert von 35,96 % nach 6-stündiger Stimulation (Abb. 3.10/A) und auf einen Wert von 12,80 % nach 24-stündiger Stimulation (Abb. 3.7/B) auf.

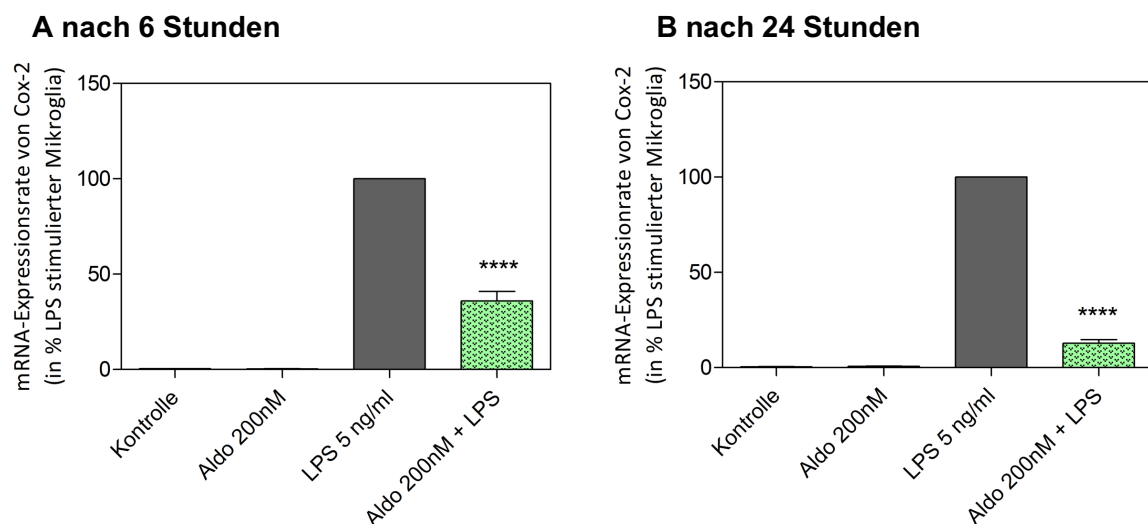


Abb. 3.10: COX-2-mRNA-Expressionsrate nach 6 und 24 Stunden. Die mittels qPCR ermittelte mRNA-Expressionsrate von COX-2 diente in den jeweiligen Stimulationen dem Nachweis einer möglichen Aktivierung von Mikroglia. Die Einzelstimulationen mit Kulturmedium bzw. Aldosteron präsentierten dabei keinerlei Auswirkungen. Ein Referenzwert (100 %) lieferte die Einzelstimulation mit LPS. **A:** Die Stimulation der durch LPS aktivierten Zellen zeigte bereits nach 6 Stunden der Stimulation eine hoch signifikante Reduktion der mRNA-Syntheserate von COX-2. **B:** Die Stimulation für 24 Stunden präsentierte eine hoch signifikante Reduktion der mRNA-Syntheserate von COX-2 ($p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.6 Einfluss von Aldosteron auf die Sekretion pro-inflammatorischer Proteine in LPS stimulierten Mikroglia mittels Sandwich-ELISA

Nachdem auf mRNA-Ebene eine deutliche anti-inflammatorische Wirkung von Aldosteron festgestellt wurde, sollte diese Wirkung nachfolgend auch auf Proteinebene (beispielhaft TNF- α und IL-6) mittels ELISA untersucht werden.

3.6.1 Reduktion der Proteinsekretion von TNF- α durch Aldosteron

Um einen möglichen Einfluss der Stimulation mit Aldosteron für 6 und 24 Stunden auf Mikroglia zu untersuchen, wurde die Proteinfreisetzung von TNF- α mittels Sandwich-ELISA (Kapitel 2.2.11) untersucht.

Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS führte zu einem Anstieg der Expressionsrate von TNF- α in Bezug zu den unstimulierten Kontrollzellen. Dieses wurde in dieser Arbeit als eine Aktivierung der Mikroglia gedeutet und diente für die Auswertung als Referenzwert von 100 %. Die Einzelstimulationen mit Aldosteron zeigten keine Effekte auf die Proteinsynthese von TNF- α , jedoch wies die Ko-Stimulation mit LPS und Aldosteron eine hoch signifikante Reduktion von TNF- α auf. So wurde nach 6-stündiger Stimulation ein Wert von 67,01 % (Abb. 3.11/A) und nach 24-stündiger Stimulation ein Relativwert von 49,46 % (Abb. 3.11/B) erreicht.

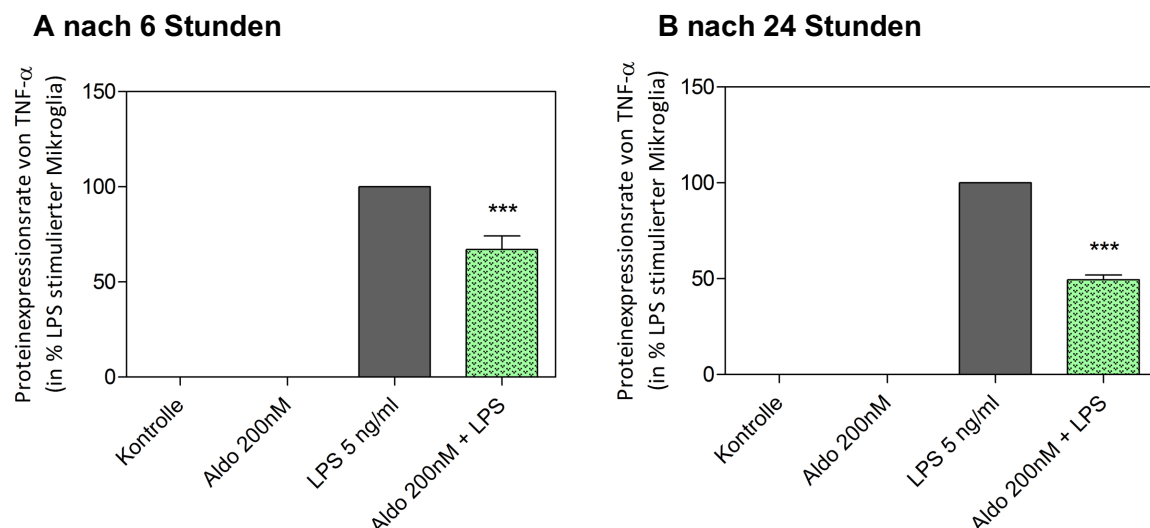


Abb. 3.11: Einfluss von Aldo auf die Proteinfreisetzung von TNF- α nach 6 und 24 Stunden. Mittels ELISA wurde die Proteinfreisetzung von TNF- α nach einer Stimulation durch Aldosteron ermittelt. Einzelstimulationen mit Kulturmedium bzw. Aldosteron zeigten dabei keine Auswirkungen. Eine Einzelstimulation mit LPS zeigte eine deutliche Steigerung der Expressionsrate und diente als Referenzwert (100 %) für die Auswertung. **A:** Die Stimulation der durch LPS aktivierten Zellen zeigte bereits nach 6 Stunden Stimulation eine hoch signifikante Reduktion der Proteinmenge von TNF- α auf 67,01 %. **B:** Die 24-stündige Stimulation lieferte den Nachweis einer hoch signifikanten Reduktion der TNF- α -Menge auf 49,46 % ($p^{***} \leq 0,001$; $n \geq 3$).

3.6.2 Reduktion der Proteinsekretion von IL-6 durch Aldosteron

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Stimulation mit Aldosteron für 6 bzw. 24 Stunden auf Mikroglia wurde die IL-6-Proteinsekretion mittels Sandwich-ELISA (Kapitel 2.2.11) untersucht.

Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS führte wie bei TNF- α zu einem Anstieg der Expressionsrate von IL-6. Die Einzelstimulationen mit Aldosteron konnten keine Effekte auf die Proteinsekretion von IL-6 aufzeigen, allerdings wies die kombinierte Stimulation mit LPS und Aldosteron eine hoch signifikante Herabregulation auf. Es wurde nach 6 Stunden Stimulationszeit ein Wert von 35,38 % (Abb. 3.12/A) und nach 24 Stunden Stimulationszeit ein Wert von 31,53 % (Abb. 3.12/B) erreicht.

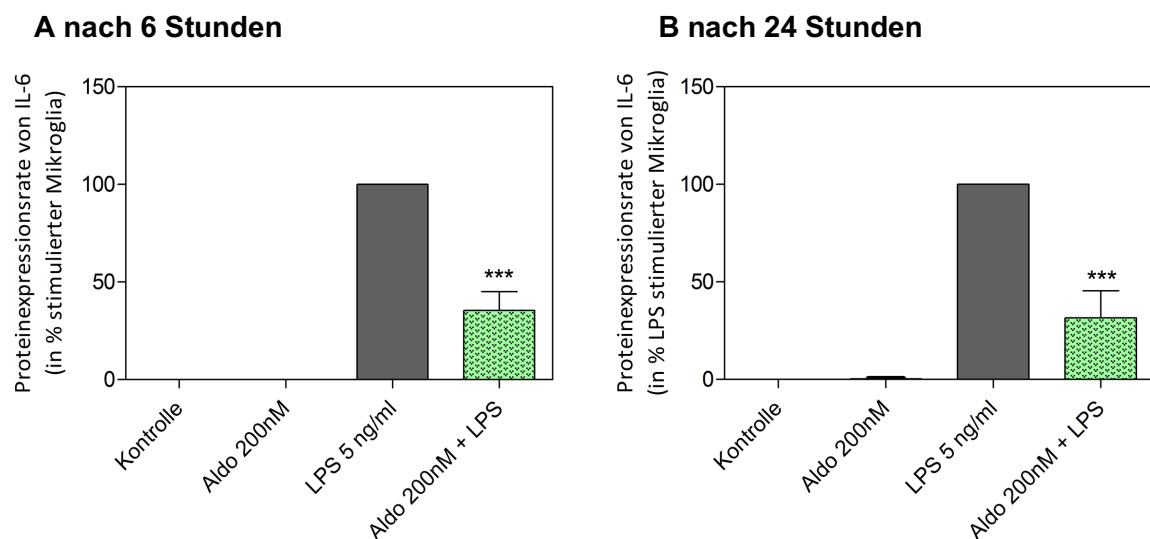


Abb. 3.12: Einfluss von Aldosteron auf die Proteinsekretion von IL-6 nach 6 und 24 Stunden. Zum Nachweis der Proteinsekretion von IL-6 nach einer Stimulation durch Aldosteron wurde ein ELISA durchgeführt. Einzelstimulationen mit Kulturmedium bzw. Aldosteron wiesen keinerlei relevante Auswirkungen auf. Bei der Einzelstimulation mittels LPS war eine deutliche Steigerung der Proteinfreisetzung erkennbar, welche weiter als Referenzwert (100 %) diente. **A:** Eine Aldosteron-Stimulation von LPS aktivierten Mikroglia zeigte nach 6-stündiger Stimulation eine hoch signifikante Reduktion der Proteinsekretion von IL-6 auf 35,38 %. **B:** Nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden war eine hoch signifikante Reduktion der Freisetzung von IL-6 auf 31,53 % zu erkennen ($p^{***} \leq 0,001$; $n \geq 3$).

3.7 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch Aldosteron in Mikroglia

Mittels Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen wurde eine mögliche Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch Aldosteron untersucht.

3.7.1 Beeinflussung der Phosphorylierung der p38-MAPK zur Phospho-p38-MAPK durch Aldosteron mittels Western Blot

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses durch Aldosteron auf den p38-MAPK-NF κ B Signalweg wurde die Phosphorylierung der p38-MAPK zur Phospho-p38-MAPK mittels Western Blot untersucht. Dabei wurden die p38-MAPK- und Phospho-p38-MAPK-Proteinbanden detektiert und dargestellt.

Nach einer 10 minütigen Stimulation zeigte der untenstehende Blot (Abb. 3.13) bei den Phospho-p38-MAPK-Banden der LPS-Stimulation ein klares Signal. Die Ko-Stimulation mit LPS und Aldosteron führte im Vergleich dazu zu einer deutlich verminderten Bandenintensität. Dahingegen zeigten die Kontrolle und die reine Aldosteron-Stimulation keine sichtbare Phospho-p38-MAPK-Bande. Jedoch konnte nach dem Strippen in allen Stimulationen eine signalstarke p38-MAPK-Bande detektiert werden.

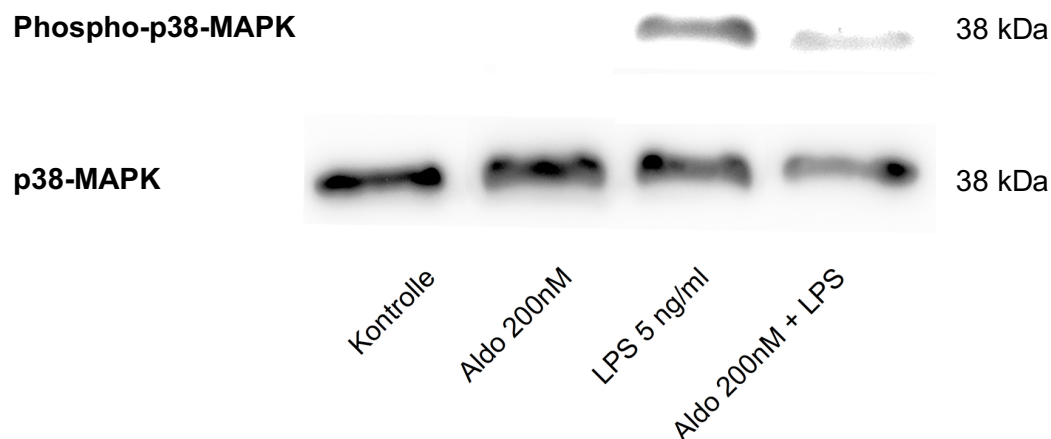


Abb. 3.13: Einfluss von Aldosteron auf den Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK Signalweg. Darstellung eines repräsentativen Blots. Western Blot Analysen dienten der Ermittlung der Phospho-p38-MAPK- und p38-MAPK-Expression in zuvor stimulierten Mikroglia. Der Vergleich der Intensität der Proteinbanden zeigte, dass Aldosteron die Phosphorylierung der p38-MAPK zur Phospho-p38-MAPK in LPS stimulierten Mikroglia verglichen mit einer reinen LPS-Stimulation reduziert ($n \geq 3$).

Danach wurden die Proteinbanden für die weitere Beurteilung der Ergebnisse densitometrisch ausgewertet. Dafür wurde die Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK-Ratio gebildet und statistisch aufgearbeitet.

Die unstimulierten Kontrollzellen sowie die Zellen der Einzelstimulation mit Aldosteron zeigten keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der p38-MAPK. Bezogen auf die LPS-Einzelstimulation mit einer als Referenzwert bestimmten Ratio von 1,0 ergab die kombinierte Stimulation mit Aldosteron und LPS eine auf 0,64 reduzierte Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK-Ratio (Abb. 3.14). Somit zeigte sich, dass eine kombinierte Stimulation mit Aldosteron und LPS im Vergleich zu einer LPS-Einzelstimulation eine höchst signifikante Reduktion der Phosphorylierung der p38-MAPK zu Phospho-p38-MAPK zur Folge hat.

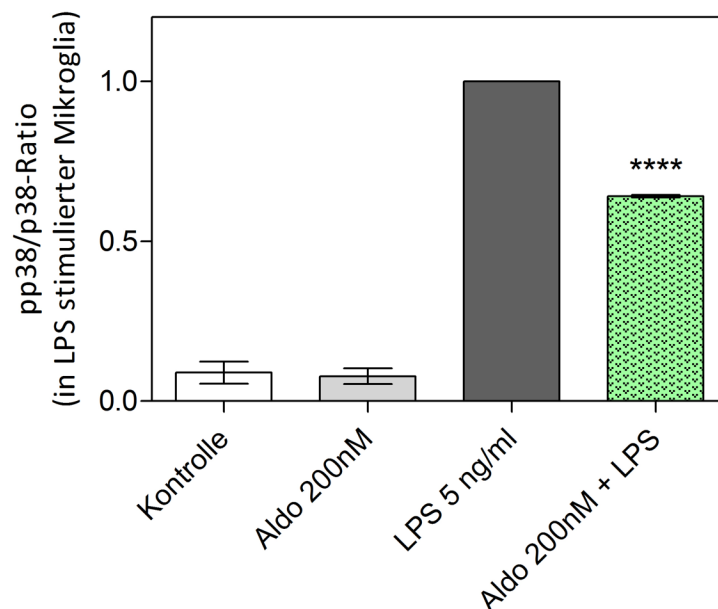


Abb. 3.14: Einfluss von Aldosteron auf den Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK Signalweg. Quantifizierte Darstellung: Western Blot Analysen dienen der Ermittlung der Phosphorylierung der p38-MAPK zur Phospho-p38-MAPK in zuvor stimulierten Mikroglia. Die Werte für die Phospho-p38-MAPK wurden für die Beurteilung eines Einflusses von Aldosteron auf intrazelluläre Signalwege ermittelt, wohingegen die p38-MAPK als Basisrate diente. Aus den densitometrisch ermittelten Werten für die Phospho-p38-MAPK und die p38-MAPK wurde jeweils die Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK-Ratio gebildet und graphisch dargestellt. Eine Einzelstimulation der Mikroglia mit LPS diente dabei als Referenz (1,0). Die Stimulation mit Aldosteron und LPS zeigte dabei eine höchst signifikante Reduktion der Ratio auf 0,64. Zellen unstimulierter Kontrollen und Aldosteron-Einzelstimulationen zeigten keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der p38-MAPK ($p^{****} \leq 0,0001$; $n = 3$).

3.7.2 Immunfluoreszenz - Darstellung von intrazellulären Signalwegen über die Kerntranslokation von NFκB

Bei der Aktivierung von Mikroglia ist auch NFκB beteiligt, welches in ruhenden Mikroglia im Zytoplasma vorliegt und bei einer mikroglialen Aktivierung in den Kern transloziert wird (39, 44).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung dieses Vorgangs mittels Immunfluoreszenz. Dabei wurden die Zellkerne blau und NFκB grün angefärbt. Bei einer Translokation von NFκB ist eine verstärkte Grünfluoreszenz im Kern erkennbar. Die unstimulierten Kontrollzellen (A) und die Zellen der reinen Aldosteron-Stimulation (B) zeigten keine deutliche NFκB-Kernfärbung.

Die LPS-Einzelstimulation (C) zeigte im Kern eine deutliche Zunahme grüner Fluoreszenz (Translokation von NFκB). Die Ko-Stimulation von Aldosteron und LPS (D) zeigte im Vergleich zur LPS-Einzelstimulation eine reduzierte Grünfluoreszenz im Kern (Aldosteron-vermittelte Reduktion der NFκB-Translokation).

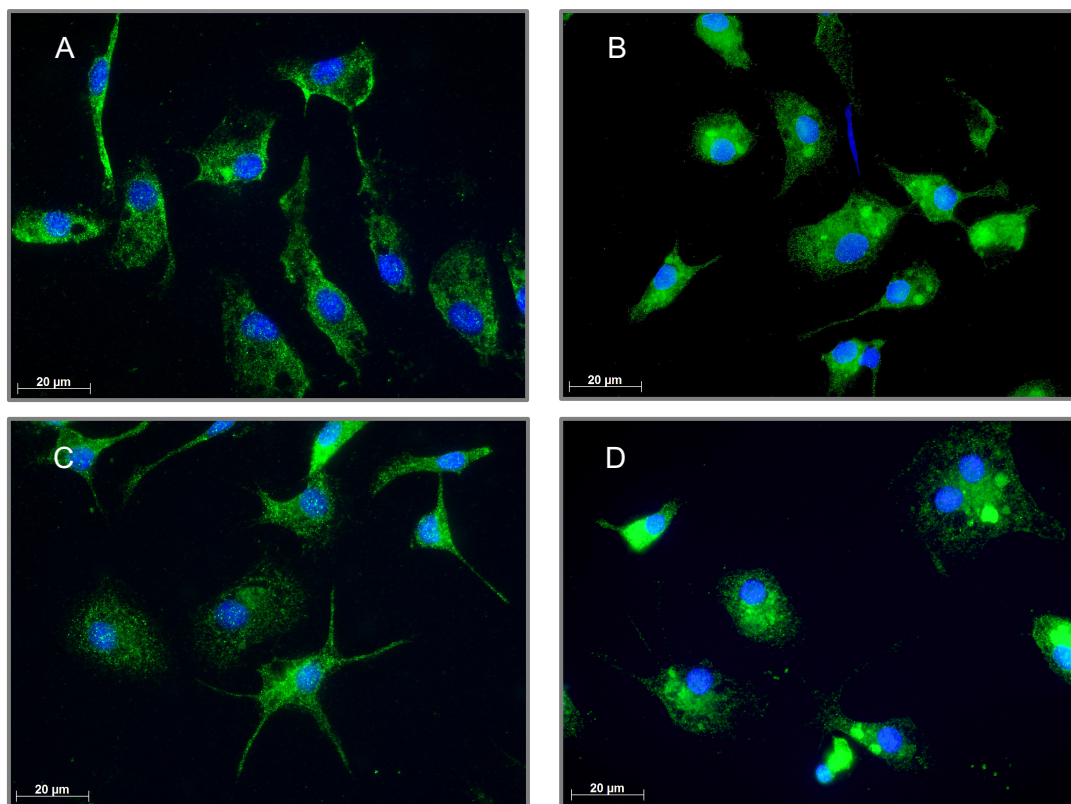


Abb. 3.15: Aldosteron-Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB: Zum Nachweis einer möglichen Translokation von NFκB im Rahmen einer mikroglialen Aktivierung wurden von den einzelnen Stimulationen Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die Zellkerne wurden blau und NFκB grün markiert. **A, KO:** NFκB im Zytoplasma, nicht im Zellkern. **B, Aldosteron:** NFκB im Zytoplasma, nicht im Zellkern. **C, LPS:** deutliche NFκB-Translokation in den Zellkern. **D, Aldosteron + LPS:** im Vergleich zur reinen LPS-Stimulation reduzierte NFκB-Translokation in den Zellkern (n = 3).

3.8 Ergebnisse des Methodenvergleiches zur RNA-Isolierung (Nucleospin® vs. Trizol®)

Wie in der Fragestellung (1.4) beschrieben, wurde in dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob unterschiedliche Methoden zur RNA-Isolierung eine Auswirkung auf die Reinheit der isolierten RNA und somit eventuell auf die Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen haben. Dabei wurde die Methode der RNA-Isolierung mittels NucleoSpin® (2.2.7.1) mit der RNA-Isolierung mit Trizol® (2.2.7.2) in mehreren voneinander unabhängigen Versuchen verglichen.

3.8.1 Vergleich der Reinheitsgrade der isolierten mRNA

Im Anschluss an die Isolierung der mRNA aus unstimulierten Zellen nach den beiden zuvor genannten Methoden, wurde zunächst jeweils die Reinheit der mRNA photometrisch bestimmt. Für die Auswertung und den Vergleich der Reinheitsgrade wurde der Wert der RNA-Isolierung mit Trizol® als hausinterner Standard und Referenz gesehen. Dieser entspricht gemittelt einer Reinheit von 1,74. Die mittels Nucleospin® isolierte RNA erreichte im Vergleich dazu eine Reinheit von 2,09. Dieser Unterschied der Reinheit wirft die Frage auf, ob die Wahl der Methode zur RNA-Isolierung somit einen Einfluss auf die mRNA-Expresionsrate haben kann (Abb. 3.16).

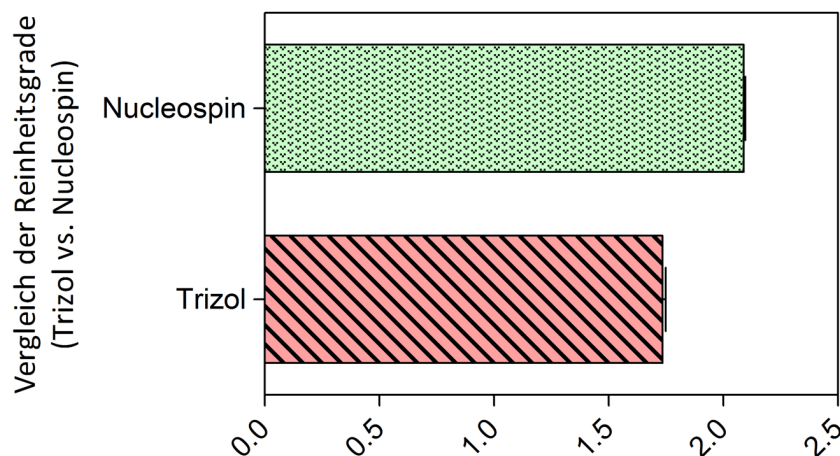


Abb. 3.16: Unterschiede des mRNA-Reinheitsgrades zwischen der mRNA-Isolierung durch Trizol® oder Nucleospin®: Eine mRNA-Isolierung mit Trizol® diente als Standard und Referenz. Die gemittelte Reinheit von 1,74 entspricht 100 %. Im Vergleich dazu wurde mittels Nucleospin® eine Reinheit von 2,09 (120,46 %) erzielt (n ≥ 4).

3.8.2 Methodenvergleich anhand der jeweiligen mRNA-Expressionsraten

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des RNA-Isolierungsverfahrens und des damit verbundenen Reinheitsgrades der isolierten RNA wurden in mehreren voneinander unabhängigen qPCRs die Expressionsraten der mRNA verglichen. Dazu wurden zzgl. zu den in den Abschnitten 3.4.2 bis 3.5.4 präsentierten qPCR-Ergebnissen nach Nucleospin®-Isolierung weitere qPCRs an mRNA durchgeführt, die unter der Anwendung von Trizol® isoliert wurde.

Bei beiden Versuchsreihen wurden die Mikroglia zuvor für 6 bzw. 24 Stunden mit einer Kontrolllösung (*Aqua bidest*), LPS (5 ng/ml), Aldosteron (200 nM), oder einer Kombination aus Aldosteron und LPS stimuliert. Dabei wurden zur Überprüfung eines Einflusses des Reinheitsgrades auf die mRNA-Expressionsrate die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β und das pro-inflammatorische Enzyme COX-2 untersucht. In Bezug zu unstimulierten Kontrollzellen führte eine LPS-Einzelstimulation der Mikroglia zu einem Anstieg der Expressionsraten, was in dieser Arbeit als mikrogliale Aktivierung gewertet wurde und als Referenzwert (100 %) diente.

Die folgende Übersichtstabelle (Tab. 1) stellt die Mittelwerte der mRNA-Expressionrate der kombinierten Stimulation mit LPS und Aldosteron für die einzelnen Zytokine bzw. Enzyme aus beiden Verfahren der RNA-Isolierung gegenüber. Es zeigt sich, dass nach 6 Stunden Stimulationszeit die Werte der Nucleospin®-Isolierung eine stärkere Herabregulation der mRNA-Expressionsrate zeigen, wohingegen nach 24-stündiger Stimulation die Werte der Trizol®-Isolierung eine verstärkte Herabregulation der mRNA-Expressionsrate (ausgenommen TNF- α) aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl die Stimulationszeit, als auch das zu untersuchende Zytokin eine Rolle bei der Auswahl des Verfahrens zur RNA-Isolierung spielt.

Tab. 1: Übersichtstabelle: qPCR-Werte nach RNA-Isolierung durch Nucleospin® oder Trizol®.

Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Verfahren zur RNA-Isolierung bezogen auf die mRNA-Expressionsraten von pro-inflammatorischen Zytokinen bzw. Enzymen nach 6- bzw. 24-stündiger Stimulation mit LPS und Aldosteron. Es werden Mittelwerte der mRNA-Expressionsraten aus qPCRs gegenübergestellt. Die verwendete RNA wurde zuvor mittels Nucleospin® oder Trizol® isoliert. Alle Werte sind Relativwerte bezogen auf eine LPS-Einzelstimulation (100 %). Es zeigt sich, dass nach 6 Stunden Stimulation die Nucleospin®-Isolierung eine stärkere Herabregulation der mRNA-Expressionsrate zeigt, wohingegen nach 24 Stunden Stimulation die Werte der Trizol®-Isolierung (ausgenommen TNF- α) eine verstärkte Herabregulation zeigen (jeweils n \geq 3).

mRNA	6 Stunden		24 Stunden	
	Nucleospin® [%]	Trizol® [%]	Nucleospin® [%]	Trizol® [%]
TNF- α	87,92	101,54	57,45	64,27
IL-6	33,73	39,73	12,35	11,76
IL-1 β	54,29	60,34	27,67	26,88
COX2	35,96	38,50	12,80	10,23

3.8.2.1 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von TNF- α nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin® oder Trizol®

Eine LPS-Einzelstimulation der Mikroglia führte in Bezug zu unstimulierten Kontrollzellen zu einem Anstieg der Expressionsrate der TNF- α -mRNA. Eine Einzelstimulation mit Aldosteron konnte dabei keine Effekte auf die TNF- α -mRNA-Expression ausüben. Eine Ko-Stimulation der Zellen durch Aldosteron und LPS führte nach 6-stündiger Stimultion zu einer Herab- bzw. Heraufregulierung der mRNA-Expressionsrate von TNF- α . Dabei erreichte die Expressionsrate nach Nucleospin®-Isolierung (A) einen Wert von 87,92 % und nach Trizol®-Isolierung (a) von 101,54 %. Nach 24-stündiger Stimulation zeigte der Ansatz der mRNA-Isolierung mittels Nucleospin® (B) eine Reduktion der Expressionsrate für TNF- α auf 57,45 % und mittels Trizol®-Isolierung (b) auf 64,27 % (Abb. 3.17).

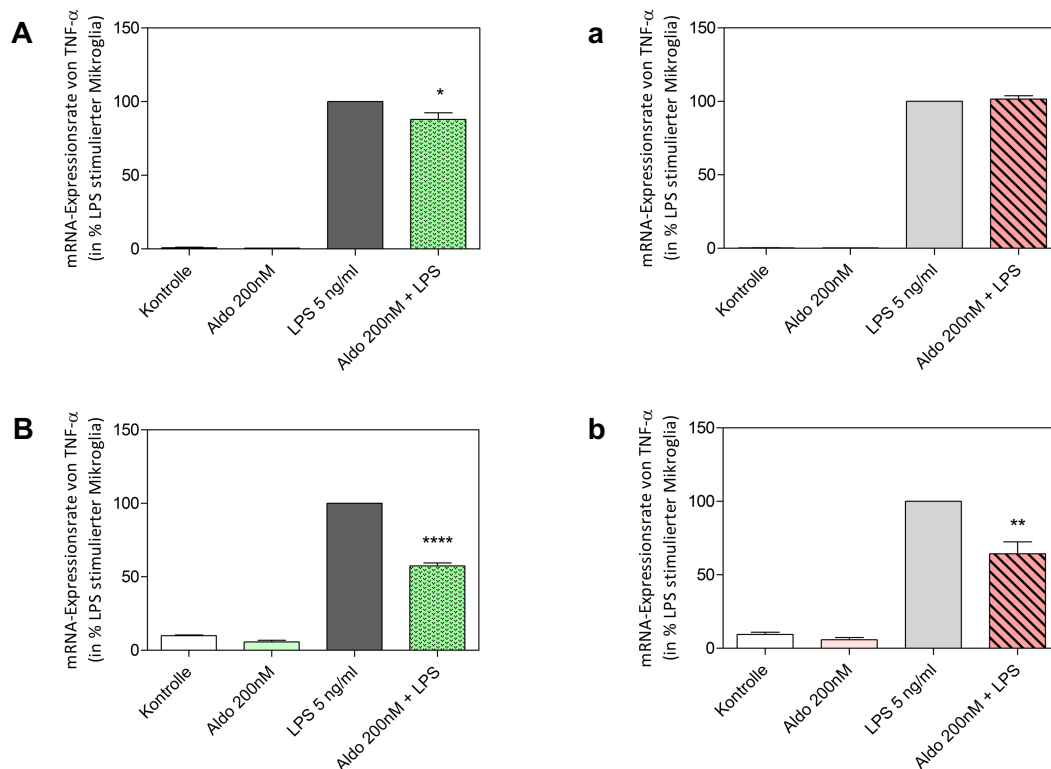


Abb. 3.17: Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von TNF- α . Es wurde die Methode der Isolierung mittels Nucleospin® mit der durch Trizol® verglichen. Eine Einzelstimulation mit LPS bezogen auf unstimulierte Kontrollzellen diente als Referenz (100 %) für die Ko-Stimulation mit Aldosteron und LPS. **A:** 6 Stunden Stimulation ergaben nach Nucleospin® einen Relativwert von 87,92 % und nach **a:** Trizol® einen Wert von 101,54 %. **B:** Bei 24-stündiger Stimulation wurde für Nucleospin® ein Wert von 57,45 % und für **b:** Trizol® ein Wert von 64,27 % erreicht ($p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.8.2.2 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von IL-6 nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin® oder Trizol®

Bezogen auf unstimulierte Kontrollzellen führte eine LPS-Einzelstimulation der Mikroglia zu einem Anstieg der Expressionsrate von IL-6. Eine Einzelstimulation mit Aldosteron zeigte keine Effekte auf die IL-6-mRNA-Expression. Eine Ko-Stimulation der Zellen durch Aldosteron und LPS führte nach beiden Verfahren nach 6 bzw. 24 Stunden Stimulationszeit zu einer höchst signifikanten Reduktion der mRNA-Expressionsrate von IL-6. Nach 6-stündiger Stimulation wurde dabei für das Verfahren des Nucleospin® (A) ein Wert von 33,73 % erreicht. Das Trizol®-Verfahren (a) erzielte im Vergleich dazu einen Wert von 39,73 %. Nach 24 Stunden Stimulation zeigte die IL-6-mRNA aus der Nucleospin®-Isolierung (B) einen Wert von 12,35 % und aus der Trizol®-Isolierung (b) einen Wert von 11,76 % (Abb. 3.18).

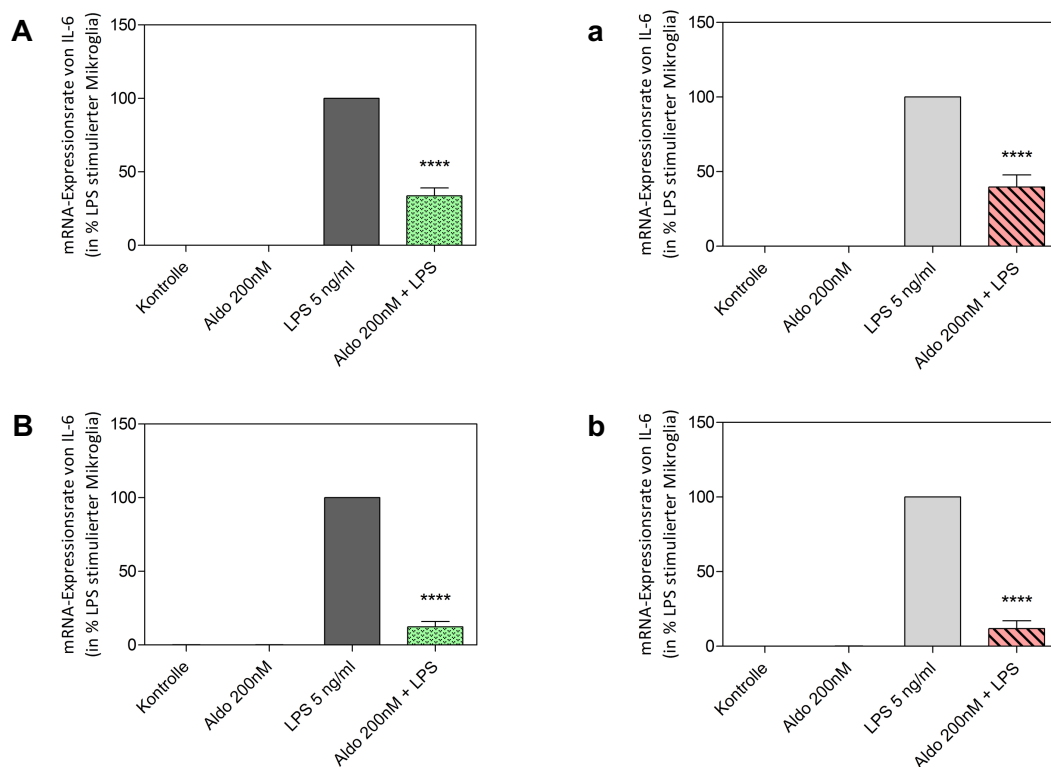


Abb. 3.18: Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von IL-6. Es wurde die Methode der mRNA-Isolierung mittels Nucleospin® mit der Methode durch Trizol® verglichen. Eine alleinige Stimulation mit LPS bezogen auf unstimulierte Kontrollzellen diente dabei als Referenzwert (100 %) für die gemeinsame Stimulation mit Aldosteron und LPS. **A:** Nach 6-stündiger Stimulation wurde mit der Nucleospin®-mRNA ein Relativwert von 33,73 % und mit der **a:** Trizol®-mRNA ein Wert von 39,73 % erreicht. **B:** 24 Stunden Stimulation ergaben für Nucleospin® einen Relativwert von 12,35 % und für **b:** Trizol® einen Wert von 11,76 % ($p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.8.2.3 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin® oder Trizol®

Eine LPS-Einzelstimulation der Mikroglia führte in Bezug zu unstimulierten Kontrollzellen zu einem Anstieg der Expressionsrate der IL-1 β -mRNA. Eine Einzelstimulation mit Aldosteron konnte dabei keine Effekte auf die IL-1 β -mRNA-Expression ausüben. Eine kombinierte Stimulation der Zellen mit Aldosteron und LPS führte in beiden Verfahren nach 6- bzw. 24-stündiger Stimulation zu einer Herabregulation der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β . Nach 6 Stunden wurde bei der Nucleospin®-mRNA (A) ein Wert von 54,29 % erreicht. Die mRNA aus der Trizol®-Isolierung (a) ergab einen Wert von 60,34 %. Nach 24-stündiger Stimulation wurde für die IL-1 β -mRNA aus Nucleospin®-Isolierung (B) ein Wert von 27,67 % und für die mRNA aus der Trizol®-Isolierung (b) ein Wert von 26,88 % erreicht. (Abb. 3.19).

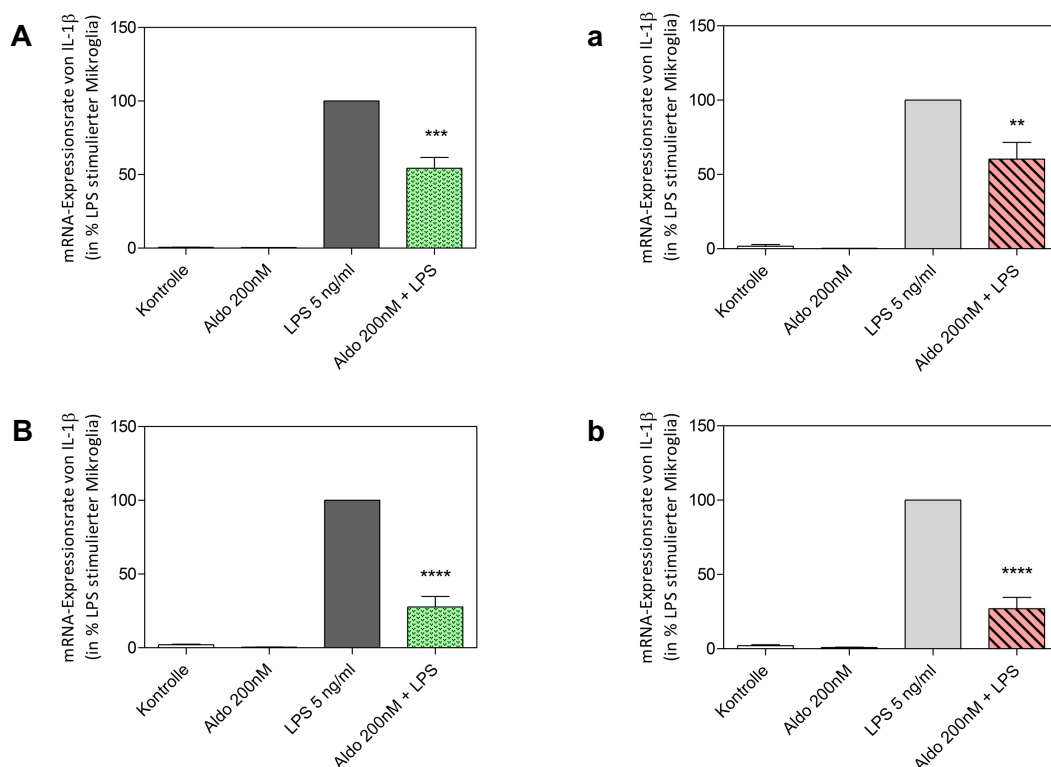


Abb. 3.19: Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von IL-1 β . Die Methode der mRNA-Isolierung mit Nucleospin® wurde mit der durch Trizol® verglichen. Eine Stimulation mit LPS allein diente bezogen auf unstimulierte Zellen als Referenz (100 %). **A:** 6 Stunden Stimulationszeit ergaben nach dem Verfahren der Nucleospin®-Isolierung einen Wert von 54,29 % und nach dem Verfahren der **a:** Trizol®-Isolierung einen Relativwert von 60,34 %. **B:** Bei 24-stündiger Stimulation wurde für die Nucleospin®-mRNA ein Wert von 27,67 % und für die **b:** Trizol®-mRNA ein Wert von 26,88 % erzielt ($p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$; $p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

3.8.2.4 Vergleich der mRNA-Expressionsrate von COX-2 nach mRNA-Isolierung mittels Nucleospin® oder Trizol®

In Bezug auf unstimulierte Kontrollzellen führte eine LPS-Einzelstimulation der Mikroglia zu einem Anstieg der Expressionsrate von COX-2. Eine Einzelstimulation mit Aldosteron konnte keine Effekte auf die COX-2-mRNA-Expressionsrate ausüben.

Eine kombinierte Stimulation der Mikroglia mit Aldosteron und LPS führte in beiden Fällen nach 6 bzw. 24 Stunden Stimulationszeit zu einer höchst signifikanten Herabregulation der mRNA-Expressionsrate von COX-2. Nach 6-stündiger Stimulation wurde dabei für das Verfahren des Nucleospin® (A) ein Relativwert von 35,96 % erzielt. Mit Trizol® (a) ergab sich im Vergleich dazu für die COX-2-mRNA ein Wert von 38,50 %. Nach 24 Stunden Stimulation wurde für die COX-2-mRNA aus der Nucleospin®-Isolierung (B) ein Wert von 12,80 % und aus der Trizol®-Isolierung (b) ein Wert von 10,23 % erreicht (Abb. 3.20).

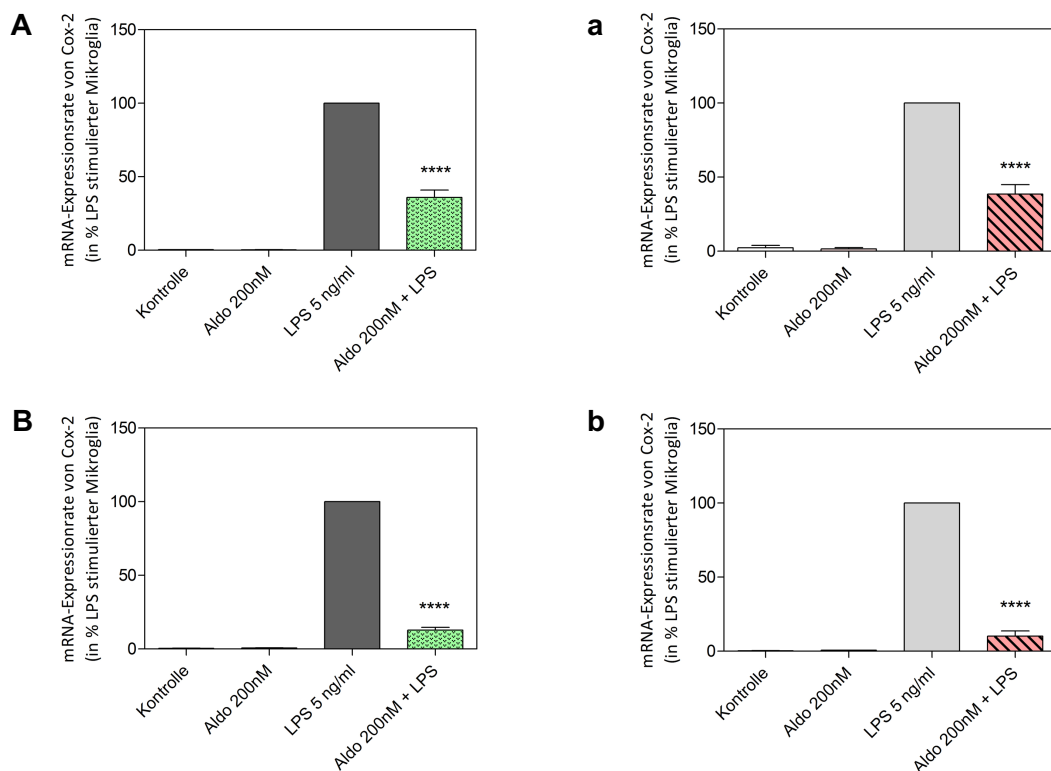


Abb. 3.20: Vergleich der Verfahren zur mRNA-Isolierung anhand der mRNA-Expressionsrate von COX-2. Die Methode der Isolierung von mRNA mittels Nucleospin® wurde mit der Methode durch Trizol® verglichen. Eine Einzelstimulation mit LPS diente dabei bezogen auf unstimulierte Kontrollzellen als Referenz (100 %) **A:** Nach 6-stündiger Stimulation wurde im Ansatz der Nucleospin®-mRNA ein Relativwert von 35,96 % und im Ansatz der **a:** Trizol®-mRNA ein Wert von 38,50 % erreicht. **B:** 24 Stunden Stimulation ergab für Nucleospin® ein Relativwert von 12,80 % und für **b:** Trizol® einen Wert von 10,23 % ($p^{****} \leq 0,0001$; $n \geq 3$).

4. Diskussion

Durch den kontinuierlichen Anstieg der Lebenserwartung und der fortschreitenden medizinischen Entwicklung werden neurodegenerative Erkrankungen und deren Therapieoptionen immer mehr Gegenstand der Forschung. Die bisher gesammelten Forschungsergebnisse weisen dabei darauf hin, dass es sich bei den Pathomechanismen dieser Erkrankungsgruppe um ein multifaktorielles Geschehen handelt, an dem sowohl genetische, altersbedingte, als auch umweltbezogene Faktoren beteiligt sind (3, 5, 8, 17, 27, 28).

Besonders in den vergangenen Jahren sind von Mikroglia mediierte Entzündungsprozesse in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Als Zellen der ersten Immunabwehr des ZNS (12) können diese unterschiedliche Morphologien mit verschiedenen immunologischen Eigenschaften einnehmen. Kommt es wie bei den neurodegenerativen Erkrankungen zu einer Entzündungsreaktion im ZNS, so nehmen die Mikroglia ihre aktivierte amöboide Form an. Im Hinblick auf die Bekämpfung einer Entzündung beginnen sie mit der Produktion pro-inflammatorischer und neurotoxischer Substanzen. Bei den neurodegenerativen Erkrankungen kommt es dabei zur Ausbildung eines *Circulus vitiosus*, den es therapeutisch zu durchbrechen gilt, um einem progredienten Verlust neuronaler Strukturen entgegen zu wirken (17, 27, 28). Im Jahr 2012 wurde durch eine Arbeitsgruppe der Sorbonne Universität Paris (42) die Wirkung von Aldosteron auf die LPS-induzierte Uveitis untersucht. Bei dieser Studie wurde unter anderem festgestellt, dass Aldosteron auch einen anti-inflammatorischen Effekt auf Mikroglia zu haben scheint, worauf die Arbeitsgruppe jedoch nicht weiter einging. Die Kenntnis dieser Befunde führte dazu, dass die Frage nach einer potentiellen anti-inflammatorischen Wirkung von Aldosteron auf Mikroglia aufkam und zum Gegenstand dieser Arbeit wurde.

4.1 Primäre Mikrogliakultur

Allgemein ist bekannt, dass Mikroglia *in vivo* durch ein umfassendes Netzwerk an Signalwegen in der Lage sind, mit benachbarten Neuronen, Makroglia, aber auch Komponenten des Immunsystems zu kommunizieren. Dies ermöglicht ihnen, Signale für die Induktion von Immunabwehrreaktionen wahrzunehmen und umzusetzen (10). Die wissenschaftliche Entwicklung hat dabei in den vergangenen Jahren gezeigt, dass es nahezu unmöglich ist dieses komplexe System an Verknüpfungen *in vitro* nachzubilden, so dass für die Versuche dieser Arbeit Primärkulturen von Mikroglia auf einem Astrozytenrasen angezüchtet wurden (Kapitel 2.2.1) (45). Die so gewonnenen Mikroglia wurden zunächst für 24 Stunden präinkubiert und danach mit LPS in An- oder Abwesenheit von Aldosteron stimuliert (Kapitel 2.2.3). Das dabei eingesetzte LPS ist dafür bekannt, dass es zu einer

Aktivierung und einer drastischen Veränderung der Morphologie von Mikroglia führt (20, 46). Diese Aktivierung geht dabei mit einer Veränderung der mikroglialen Zytokinausschüttung einher, über die sich unter anderem ein möglicher anti-inflammatorischer Effekt von Exogenen, in diesem Fall Aldosteron, messen und nachweisen lässt (47, 48).

4.2 Aldosteron als geeignete Substanz – MTT-Test und Rezeptornachweis

Der im Allgemeinen der Toxizitätsbestimmung einer Substanz auf Experimentalzellen dienende MTT-Test (49) wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Wirkung von Aldosteron auf Mikroglia zu überprüfen.

Die daraus resultierenden Ergebnisse (Kapitel 3.1) lassen erkennen, dass mit 200 nm Aldosteron behandelte Mikroglia im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen *in vitro* eine geringe Reduktion des MTT aufweisen, was mit einem Rückgang der Zellaktivität in Zusammenhang gebracht werden könnte. Dahingegen hatten 5 ng/ml LPS und eine Kombination von Aldosteron und LPS keinen solchen Effekt auf Mikroglia. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen Aldosteron in Bezug auf dessen Wirkung auf Mikroglia weiter *in vitro* zu untersuchen, sofern ein Vorliegen des MCR zur Bindung von Aldosteron in Mikroglia nachgewiesen werden kann.

Das Vorliegen des MCR in Mikroglia wurde bereits 1997 durch Tanaka *et al.* (38) sowie 2012 durch Bosquet *et al.* (42) beschrieben und in dieser Arbeit mittels einer dazu durchgeführten PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese nochmals für unsere Zellen bestätigt.

Diese Tatsachen qualifizierten Aldosteron als Substanz mit einem möglichen Einfluss auf mikrogliale inflammatorische Prozesse und bilden den Ausgangspunkt für die Durchführung der weiteren Versuche dieser Arbeit.

4.3 Einfluss auf die NO-Synthese durch Aldosteron

Im Rahmen von neuronalen Entzündungen kommt es zu einer erhöhten Synthese von NO, das in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine erhebliche Rolle einnimmt und zudem an einem neuronalen Zelltod beteiligt sein kann (19, 50). Dabei gilt auch hier die circa im Jahr 1530 von Paracelsus aufgestellte Behauptung: „*Sola dosi facit venenum*“ („Nur die Dosis macht das Gift“). Somit zeigt NO in niedrigen Konzentrationen einen positiven Effekt auf das Überleben von Zellen. Höhere NO-Konzentrationen gehen allerdings mit der Bildung von reaktiven Oxidationsprodukten einher, die vornehmlich eine erhöhte Zytotoxizität besitzen (51). Im Rahmen einer mikroglialen Aktivierung kommt es neben der Bildung von NO und Superoxiden auch zur Bildung von Peroxynitrit, welches den neuronalen Zelltod auslöst (51).

Die Synthese von NO erfolgt durch eine katalytische Reaktion mittels NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin. Physiologisch sorgen dabei zwei Enzym-Isoformen; eNOS (endotheliale NOS) und nNOS (neuronale NOS) für die NO-Synthese. Im Rahmen einer neuronalen Entzündungsreaktion wird in Mikroglia die sogenannte induzierbare NO-Synthase (iNOS) als dritte Isoform aktiv. Sie ist für die Überproduktion von NO und die damit einhergehende Zellschädigung verantwortlich (51, 52). Die Tatsache, dass iNOS vorwiegend in aktivierten Mikroglia aktiv ist, macht eine Beurteilung des Entzündungs- bzw. Aktivierungsgrades der Mikroglia über eine quantitative Analyse von iNOS und dessen Syntheseprodukt NO möglich (53). Ausgehend von der Hypothese, dass Aldosteron einen anti-inflammatorischen Effekt auf Mikroglia ausübt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Aldosteron auf die Induktion der iNOS-mRNA-Synthese und die Freisetzung von NO untersucht. Dabei konnte im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen gezeigt werden, dass die LPS-Stimulation von Mikroglia zu einem erheblichen Anstieg der iNOS-mRNA-Menge und der NO-Freisetzung führte.

Darauf bezogen zeigen die in Kapitel 3.4.2 aufgeführten Ergebnisse eine hoch signifikante Herabregulation der iNOS-mRNA-Freisetzung durch Aldosteron in LPS-aktivierten Mikroglia. So wurde die Freisetzung der iNOS-mRNA nach einer 6-stündigen Stimulation um 38,47 % und nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden um 89,50 % herabreguliert.

Auch die Ergebnisse zur NO-Synthese zeigen, dass es in LPS-aktivierten Mikroglia zu einer signifikanten Herabregulation der NO-Freisetzung durch Aldosteron kommt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass es verglichen mit einer 6-stündigen Stimulation bei 24-stündiger Stimulation zu einer stärkeren Herabregulation der NO-Synthese kommt, die zudem eine höhere Signifikanz aufweist.

Die parallele Betrachtung der Ergebnisse der iNOS-mRNA-Expressionsrate und der NO-Synthese zeigt, dass es unter dem Einfluss von Aldosteron zu einer Herabregulation der iNOS-Aktivität kommt, was wiederum zu einer Reduktion der NO-Synthese führt. Diese herabregulierende Beeinflussung der beschriebenen mikroglialen Prozesse durch Aldosteron ist ein erster Beleg für die eingangs vermutete anti-inflammatorische Wirkung auf Mikroglia und lässt zusätzlich auf eine Zeit-Wirkungs-Beziehung von Aldosteron schließen.

4.4 Beeinflussung der mRNA- und Proteinsynthese von pro-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen

Wie zuvor beschrieben deutet die Herabregulation der iNOS-mRNA-Expression und der NO-Synthese in LPS-aktivierten Mikroglia nach einer Behandlung mit Aldosteron auf einen anti-inflammatorischen Effekt durch dieses Hormon hin. Um diesen Effekt weiter zu belegen, wurde der Einfluss von Aldosteron auf einige, bei neurodegenerativen Prozessen hochregulierte

pro-inflammatorische Zytokine und Enzyme untersucht. Der Literatur nach kommt es bei den neurodegenerativen Erkrankungen MS, AD und PD auf unterschiedlichen Wegen zu einer Neuroinflammation, einhergehend mit einer Aktivierung von Mikroglia (3, 5, 8). Diese mikrogliale Aktivierung führt unter anderem zu einer Synthese- und Sekretionssteigerung der als pro-inflammatorisch beschriebenen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (54), was zu einem *Circulus vitiosus* der Neuroinflammation führt. Ein Einblick in die Literatur zeigt, dass es sich bei einem Anstieg dieser Zytokine und des pro-inflammatorischen Enzymes COX-2 um ein gemeinsames Merkmal der neurodegenerativen Erkrankungen PD (32, 55, 56), MS (57, 58) und AD (28, 59) handelt. Mit der Kenntnis über eine durch mikrogliale Aktivierung ausgelöste Neuroinflammation in der Pathogenese von PD, MS und AD kann also angenommen werden, dass eine reduzierte Zytokin- bzw. Enzymsynthese eine Minderung der Entzündungsaktivität bewirkt, die wiederum zu einem indirekten neuroprotektiven Effekt führen kann.

In dieser Arbeit wurden qPCRs von Mikroglia-mRNA durchgeführt, um einen möglichen Einfluss von Aldosteron auf LPS stimulierte Mikroglia quantitativ auszuwerten. Dabei wurde die mRNA-Menge von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α) bzw. Enzymen (COX-2) untersucht. Unter dem Einfluss von Aldosteron zeigte sich nach 6 bzw. 24 Stunden Stimulationszeit eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge für IL-1 β , IL-6, TNF- α und COX-2. Die Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass eine 24-stündige Stimulation im Vergleich zu einer 6-stündigen Stimulation mit einer deutlich stärkeren Herabregulation der mRNA-Mengen durch Aldosteron einhergeht und dabei eine höhere Signifikanz aufweist. Diese signifikante Herabregulation der untersuchten Entzündungsmediatoren durch Aldosteron zeigt, dass Aldosteron in der Lage ist diese pro-inflammatorischen Prozesse herabzuregulieren.

Die Untersuchung des Zellkulturmediumüberstandes mittels ELISA erbrachte für TNF- α und IL-6 vergleichbare Ergebnisse auf Proteinebene. Die Befunde zeigen, dass es durch die kombinierte Stimulation der Mikroglia mit LPS und Aldosteron im Vergleich zur Einzelstimulation mit LPS zu einer Herabregulation der Proteinfreisetzung von TNF- α und IL-6 kommt. Der weitere Vergleich der Ergebnisse für eine Stimulation von 6 bzw. 24 Stunden zeigte, dass eine längere Aldosteron-Stimulation mit einer stärkeren Herabregulation der freigesetzten Proteinmenge einhergeht, was für eine Zeit-Wirkungs-Beziehung des Aldosteron-Einflusses spricht. Somit konnte mit hoher Signifikanz auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass Aldosteron die Fähigkeit besitzt pro-inflammatorische Mediatoren herabzuregulieren.

Zusammengefasst kommt es bei neurodegenerativen Erkrankungen durch unterschiedliche Noxen zu einer frühzeitigen mikroglialen Aktivierung, einhergehend mit einem Anstieg

pro-inflammatorischer Moleküle. Die Inkubation mit Aldosteron war sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene in der Lage, diese pro-inflammatorischen Prozesse signifikant herabzuregulieren.

4.5 Beteiligung intrazellulärer Signalwege

Neben einer Aktivierung des p38-MAPK-NFκB Signalweges durch LPS (10), führt auch die Bindung von Aldosteron an den MCR zu einer Aktivierung dieses intrazellulären Signalweges (39). Dabei wurde bereits in anderen Zusammenhängen ein Vorliegen von p38 und NFκB in Mikroglia durch Kettenmann *et al.* (10) und Chantong *et al.* (60) beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass die endotheliale MCR-Bindung von Aldosteron sowohl zu einer vermehrten Phosphorylierung von p38 zu Phospho-p38, als auch zu einer Aktivierung mit Translokation von NFκB in den Kern führt, was wiederum eine gesteigerte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine bewirken kann (39, 60).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Aldosteron auf den p38-MAPK-NFκB-Signalweg mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei zeigten die mit Aldosteron und LPS kostimulierten Zellen im Vergleich zu einer LPS-Einzelstimulation eine Abnahme des phosphorylierten p38. Dies spricht dafür, dass die Aldosteron-Stimulation von aktivierten Mikroglia zu einer reduzierten Aktivierung des pro-inflammatorisch wirkenden p38-MAPK-NFκB Signalweges führt.

Die darüber hinaus durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen dienten bei gleicher Versuchskonstellation der Abbildung des Verhaltens von NFκB unter dem Einfluss von Aldosteron. Dabei zeigte sich, dass es durch die Anwendung von Aldosteron auf LPS aktivierte Mikroglia zu einer verminderten Translokation von NFκB in den Kern kommt, was ebenfalls für eine verminderte Zellaktivierung durch Aldosteron spricht.

Zusammenfassend führt die Anwendung von Aldosteron auf aktivierte Mikroglia zu einer Herabregulation pro-inflammatorischer Signalwege, was wiederum die Hypothese der anti-inflammatorischen Wirkung von Aldosteron auf Mikroglia bestärkt. Somit kommt es im Vergleich zur beschriebenen pro-inflammatorischen Reaktion nach endothelialer MCR-Bindung (39) in den Mikroglia zu einem anti-inflammatorischen und somit umgekehrten Effekt, was die durch Chantong *et al.* (60) geäußerte Vermutung eines ebenfalls pro-inflammatorischen Effektes der MCR-Bindung in Mikroglia in den Hintergrund rücken lässt.

4.6 Aldosteron in der Zukunft – ein Ausblick

Alles in allem erscheint Aldosteron als eine potente Substanz, um einer Neuroinflammation auf mikroglialer Ebene entgegen zu wirken. Allerdings zeigen viele Studien auf, dass es durch erhöhte systemische Aldosteron-Spiegel am Endothel zu erheblichen Schädigungen kommen kann, die mit arterieller Hypertonie und Arteriosklerose einhergehen können (39, 61, 62). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint Aldosteron für eine systemische Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen auszuschneiden, sollte aber im Rahmen der fortschreitenden Entwicklung von Arzneimitteln nicht in Vergessenheit geraten. Sollte es gelingen Aldosteron an eine Trägersubstanz zu koppeln, so dass es seine Wirkung nur lokal im ZNS nach Passage der Bluthirnschranke entfaltet, könnte es einen neuen Therapieansatz neurodegenerativer Erkrankungen mit sich bringen. Zudem rückt neben den aufgeführten neurodegenerativen Erkrankungen ein anderes mögliches Einsatzgebiet für Aldosteron in den Fokus. Studien haben gezeigt, dass eine intravitreale Injektion von Aldosteron sowohl bei Uveitis, als auch bei der Retinopathie zu einem Rückgang der mikroglialen Aktivierung und Symptomatik führen kann (42, 63). Dabei kommt es durch die rein intravitreale Injektion vorwiegend zu einer lokalen Wirkung des Aldosterons, wodurch systemische Nebenwirkungen ausbleiben scheinen. Dies lässt darauf schließen, dass Aldosteron für die Behandlung degenerativer Erkrankungen am Auge von Interesse sein kann, wie beispielsweise in der Therapie der bisher noch als unheilbar geltenden altersbedingten Makuladegeneration, deren Pathogenese unter anderem eine Aktivierung von Mikroglia beinhaltet (64).

4.7 Methodenvergleich – Einfluss der Probenreinheit auf die Ergebnisse

Die unterschiedlichen Untersuchungen an Mikroglia ließen vermuten, dass die Probenreinheit einen wesentlichen Faktor für die Güte der Versuchsergebnisse darstellt. Um ggf. in zukünftigen Experimenten noch präzisere Ergebnisse zu erlangen, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die RNA-Isolierung durch Trizol[®] mit der RNA-Isolierung mittels Nucleospin[®] verglichen.

Bei den untersuchten RNA-Isolierungsmethoden handelt es sich um gängige Verfahren, die bereits in den zurückliegenden Jahren anhand von Blutproben verglichen wurden (65, 66). Dabei wurde gezeigt, dass die mittels Trizol[®] isolierte RNA oft einen erheblichen Anteil an DNA-Rückständen beinhaltet, welche eine Verunreinigung der Probe darstellen und somit zu einer geringeren Probenreinheit führen. Die im Gegensatz dazu nach dem Nucleospin[®]-Verfahren isolierte RNA weist der Literatur nach einen deutlich geringeren Anteil an DNA-Rückständen auf, was die Probenreinheit begünstigt (66). Sofern davon

ausgegangen wird, dass DNA-Rückstände und die damit einhergehende geringere Probenreinheit einen negativen Einfluss auf nachfolgende Versuche haben, lässt sich vermuten, dass die RNA-Isolierung mittels Nucleospin® im Vergleich zum Trizol®-Verfahren die bessere Methode ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Vergleich der beiden RNA-Isolierungs-Verfahren die Reinheit der einzelnen isolierten RNA-Proben gegenübergestellt. Dieser Vergleich zeigte, dass die nach dem Nucleospin®-Verfahren isolierte RNA einen deutlich höheren Reinheitsgrad aufweist und bestätigt somit die aus der Literatur bekannten Ergebnisse (65, 66).

Für die Ermittlung eines eventuellen Einflusses der Probenreinheit auf nachfolgende Versuche wurden in dieser Arbeit zusätzlich die Ergebnisse der mRNA-Freisetzung von TNF- α , IL-6, IL-1 β und COX-2 zum Einfluss von Aldosteron auf Mikroglia verglichen. Die dazu verwendeten RNA-Proben wurden zuvor entweder nach dem Nucleospin®- oder Trizol®-Verfahren gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA-Isolierung mittels Nucleospin® nach einer 6-stündigen Stimulation (ausgenommen für TNF- α) signifikantere Ergebnisse erzielt, als die RNA-Isolierung mittels Trizol®. Die Vermutung, dass dies auch nach 24-stündiger Stimulation der Fall sein würde, wurde jedoch durch die weiteren Ergebnisse widerlegt. So konnte nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden der umgekehrte Effekt beobachtet werden. Demnach scheint unter der Anwendung von Aldosteron nicht nur die unterschiedliche Probenreinheit, sondern auch die Stimulationszeit einen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse zu haben.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die RNA-Isolierung mittels Nucleospin® in Bezug auf die Probenreinheit ein besseres Verfahren ist, als die RNA-Isolierung mit Trizol®. So bestätigt diese Arbeit in diesem Punkt die Aussage von Kim *et al.* (66), dass das Nucleospin®-Verfahren das „bessere“ sei.

Darüber hinaus zeigte diese Arbeit, dass die Probenreinheit und somit die Auswahl des Verfahrens zur RNA-Isolierung nur bedingt einen Effekt auf die Ergebnisse weiterer Versuche hat. Vielmehr scheinen die Ergebnisse durch zusätzliche Faktoren, wie beispielsweise die Stimulationszeit beeinflusst zu werden, worauf in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wurde.

5. Zusammenfassung

Bei der Erforschung der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie MS, PD und AD, rückten in den vergangenen Jahren besonders Mikroglia in den Fokus der Wissenschaft. Dabei konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden, ob die mikrogliale Aktivierung und die damit einhergehende pro-inflammatorische Aktivität die Ursache für die Neurodegeneration sind, oder diese eine immunologische Antwort auf die einzelnen Erkrankungen darstellen. Zweifelsohne lösen Mikroglia in der Pathogenese dieser Erkrankungen pro-inflammatorische Kaskaden aus, die über einen *Circulus vitiosus* die Neurodegeneration kontinuierlich antreiben.

Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit war es, zunächst den Einfluss von Aldosteron auf aktivierte Mikroglia in Hinblick auf eine anti-inflammatorische Wirkung zu untersuchen. Dazu wurde vorab eine mögliche Toxizität des Aldosterons auf die Zellen einer primären Mikroglialkultur ausgeschlossen und der für die biologische Wirkung nötige MCR auf den Mikroglia per PCR nachgewiesen. Die im Anschluss daran durchgeführten Versuche dienten der Ermittlung des Einflusses von Aldosteron auf die im Rahmen einer Neurodegeneration erhöhte Sekretion von NO, pro-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen. Die Ergebnisse zeigten dabei, dass eine Aldosteron-Stimulation von LPS aktivierten Mikroglia zu einem signifikanten Rückgang der NO-Sekretion und der iNOS-mRNA-Synthese führt, was einen ersten Anhaltspunkt für eine anti-inflammatorische Wirkung des Aldosterons lieferte, die es in weiteren Versuchen zu bestätigen galt.

Die Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigten in den dazu durchgeführten relativen qPCRs auch einen Rückgang der Entzündungsmediatoren unter dem Einfluss von Aldosteron. Dabei ließen sich signifikante bis höchst signifikante Reduktionen der mRNA-Synthese für die pro-inflammatorischen Zytokine und Enzyme IL-6, TNF- α , IL-1 β , iNOS und COX-2, nachweisen. Die darüber hinaus durchgeführten Untersuchungen des Zellkulturüberstandes mittels ELISA zeigten anhand von IL-6 und TNF- α auch auf Proteinebene einen Rückgang der mikroglialen Aktivität unter Aldosteron, was einen weiteren Anhaltspunkt dafür liefert, dass Aldosteron einen anti-inflammatorischen Effekt auf Mikroglia hat.

In ergänzenden Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen konnte zudem gezeigt werden, dass es durch den Einfluss von Aldosteron zu einer verminderten Aktivität des durch LPS aktivierten Phospho-p38-MAPK/p38-MAPK- bzw. NF κ B-Signalweges kommt.

Zweiter Gegenstand dieser Arbeit war es einen Vergleich zweier Verfahren zur RNA-Isolierung in Bezug auf deren Einfluss auf die Probenreinheit und qPCR-Ergebnisse zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Methode mittels Nucleospin® im Vergleich zur Methode mittels Trizol® zu einer höheren Probenreinheit führt. Diese besitzt jedoch nur bedingt einen Einfluss auf die Ergebnisse der qPCR, so dass es den Ergebnissen nach bei Mikroglia keine bedeutende Rolle spielt, welches Verfahren für die RNA-Isolierung genutzt wird.

Sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem Schluss, dass Aldosteron im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen einen anti-inflammatorischen Effekt auf Mikroglia auslösen kann, wobei eine systemische Anwendung in der Klinik aufgrund des kardialen und endothelialen Nebenwirkungspotentials als sehr unwahrscheinlich gilt. Dennoch sollte Aldosteron unter der fortschreitenden Weiterentwicklung auf dem Gebiet gezielter Therapiestrategien nicht in Vergessenheit geraten, da eine im ZNS lokal wirkende Applikationsform einen Durchbruch in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen mit sich bringen kann. Darüber hinaus deuten Studien im Fach der Ophthalmologie darauf hin, dass Aldosteron bei einer intravitrealen Injektion entzündliche Prozesse mit mikroglialer Beteiligung im Auge mindern kann, woraus sich gegebenenfalls ein anderes klinisches Anwendungsgebiet für Aldosteron erschließt (42). Dieses gilt es in der Zukunft weiter zu verfolgen, um beispielsweise neue Therapiestrategien zur Behandlung der bisher als unheilbar geltenden altersbedingten Makuladegeneration zu finden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Garrard, P., Peters, T.J., (2012): Multiple sclerosis or neuromyelitis optica? Re-evaluating an 18th-century illness using 21st-century software. *J R Soc Med Sh Rep.* 3: 1
- (2) McDonald, W. I., (1999): Physicians, subsequence and consequence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 67: 282-289
- (3) Loma, I., Heyman, R. (2011): Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Current Neuropharmacology.* 9: 409-416
- (4) Simone, I.L., Carrara, D., Tortorella, C., Ceccarelli, A., Livrea, P. (2000): Early onset multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 21: 861-863
- (5) Holtzman, D.M., Morris John, C., Goate, A. (2011): Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 3 (77)
- (6) Li, G., Silverman, J.M., Smith, C.J., Zaccario, M.L., Schmeidler, J., Mohs, R.C., Davis, K.L. (1995): Age at onset and familial risk in alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.* 152 (3): 424-430
- (7) Pearce, J.M.S. (1989): Aspects of the history of parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 52: 6-10
- (8) Lees, A.J., Hardy, J., Revesz, T. (2009): Parkinson's disease. *Lancet.* 374 (9691): 684
- (9) Mehanna, R. (2014): Comparing clinical features of young onset, middle onset and late onset parkinson's disease. *J Parkreldis.* 20 (05): 530-534
- (10) Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011): Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 91: 461-553
- (11) Perry, V.H. (1998): A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 90 (2): 113-121
- (12) Napoli, I., Neumann, H. (2009): Microglia clearance function in health and disease. *J Neuroscience.* 158 (3): 1030-1038
- (13) Harry, J.G., Kraft, A.D. (2012): Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology.* 33 (2): 191-206
- (14) Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308 (5726): 1314-1318
- (15) Kierdorf, K., Prinz, M. (2013): Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci.* 7: 44
- (16) Perry, V.H., Nicoll, J.A., Holmes, C. (2010): Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 6 (4): 193-201

- (17) Perry, V.H., Holmes, C. (2014): Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 10: 217-224
- (18) Horling, K., Schlegel, G., Schulz, S., Vierk, R., Ullrich, K., Santer, R., Rune, G.M. (2015): Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria. *Hum Mol Genet.* 24 (4): 1007-1018
- (19) Vincent, V.A., Tilders, F.J., Van Dam, A.M. (1997): Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role of transforming growth factor beta. *Glia.* 19 (3): 190-198
- (20) Perry, V.H., Teeling, J. (2013): Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 35: 601-612
- (21) Tan, J., Town, T., Paris, D., Placzek, A., Parker, T., Crawford, F., Yu, H., Humphrey, J., Mullan, M. (1999): Activation of microglial cells by the CD40 pathway: relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 97 (1-2): 77-85
- (22) Zusso, M., Methot, L., Lo, R., Greenhalgh, A.D., David, S., Stifani, S. (2012): Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J Neurosci.* 32 (33): 11285-11298
- (23) Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D.N., Luckow, B., Brocker, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F., Prinz, M. (2013): Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* 16 (3): 273-280
- (24) Orihuela, R., McPherson, C.A., Harry, G.J. (2015): Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol.* [Epub ahead of print]
- (25) Tang, Y., Le, W. (2015): Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. [Epub ahead of print]
- (26) Zindler, E., Zipp, F. (2010): Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 24 (4): 551-562
- (27) Bogie, J.F., Stinsissen, P., Hendriks, J.J. (2014): Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 128 (2): 191-213
- (28) Mandrekar, S., Landreth, G.E. (2010): Microglia and inflammation in alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 9 (2): 156-167
- (29) Qian, L., Flood, P.M. (2008): Microglial cells and parkinson's disease. *Immunol Res.* 41 (3): 155-164
- (30) Qian, L., Flood, P.M., Hong, J.-S. (2010): Neuroinflammation is a key player in parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm.* 117 (8): 971-979

- (31) Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., Carrillo-Jiménez, A., Oliva-Martin, M.J., Garcia-Revilla, J., Garcia-Quintanilla, A., de Pablos, R.M., Venero, J.L. (2015): Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 9: 312
- (32) Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., Lucius, R. (2003): Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for parkinson's disease. *FASEB J.* 2003; 17 (3): 500-502
- (33) Booth, R.E., Johnson, J.P., Stockand, J.D. (2002): Aldosterone. *Adv Physiol Educ.* 26: 8-20
- (34) Williams, J.S., Williams, G.H. (2003): 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (6): 2364-2372
- (35) Bollag, W.B. (2014): Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol.* 4 (3): 1017-1055
- (36) Funder, J.W. (2005): Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev.* 10 (1): 15-22
- (37) Dinh, Q.N., Arumugam, T.V., Young, M.J., Drummond, G.R., Sobey, C.G., Chrissobolis, S. (2012): Aldosterone and the mineralocorticoid receptor in the cerebral circulation and stroke. *Exp Transl Stroke Med.* 4: 21
- (38) Tanaka, J., Fujita, H., Matsuda, S., Toku, K., Sakanaka, M., Maeda, N. (1997): Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia.* 22 (1): 23-37
- (39) Zhu, C.J., Wang, Q.-Q., Zhou, J.-I., Liu, H.-Z., Hua, F., Yang, H.-Z., Hu, Z.-W. (2012): The mineralocorticoid receptor-p38MAPK-NFκB or ERK.Sp1 signal pathways mediate aldosterone-stimulated inflammatory and profibrotic responses in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacologica Sinica.* 33: 873-878
- (40) Gilbert, K.C., Brown, N.J. (2010): Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 17 (3): 199-204
- (41) Kasal, D.A.B., Schiffrin, E.L. (2012): Angiotensin II, aldosterone, and anti-inflammatory lymphocytes: interplay and therapeutic opportunities. *Int J Hypertens.*
- (42) Bousquet, E., Zhao, M., Ly, A., Leroux les Jardins, G., Goldenberg, B., Naud, M.-C., Jonet, L., Besson-Lescure, B., Jaisser, F., Farman, N., De Kozak, Y., Behar-Cohen, F. (2012): The aldosterone-mineralocorticoid receptor pathway exerts anti-inflammatory effects in endotoxin-induced uveitis. *PLoS One.* 7 (11): e49036
- (43) Mosmann, T., (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assaya. *J Immunol Methods.* 65 (1-2): 55-63
- (44) Kaltschmidt, B., Wideram D., Kaltschmidt, C. (2005): Signaling via NF-kB in the nervous system. *Biochemica et Biophysica Acta BBA.* 287-299

- (45) Ni, M., Aschner, M. (2010): Neonatal rat primary microglia: Isolation, culturing and selected applications. *Curr Protoc Toxicol.* 12.17
- (46) Nakamura, Y., Si, Q.S., Kataoka, K. (1999): Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res.* 35 (2): 95-100
- (47) Wilms, H., Sievers, J., Rickert, U., Rostami-Yazdi, M., Mrowietz, U., Lucius, R. (2010): Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 β , TNF- α and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation.* 7: 30
- (48) Gan, P., Zhang, L., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, F., Zhou, X., Zhang, X., Gao, B., Zhen, X., Zhang, J., Zheng, L.T. (2015): Anti-inflammatory effects of glaucocalyxin B in microglia cells. *J Pharmacol Sci.* 128: 35-46
- (49) van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L., Cloos, J. (2011): Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 731: 237-245
- (50) Yuste, J.E., Tarragon, E., Campuzano, C.M., Ros-Bernal, F. (2015): Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci.* 7: 124
- (51) Sierra, A., Navascués, J., Cuadros, M.A., Calvente, R., Martín-Oliva, D., Ferrer-Martín, R.M., Martín-Estebané, M., Carrasco, M.-C., Marín-Teva, J.L. (2014): Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One.* 9 (8)
- (52) Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007): Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87 (1): 315-424
- (53) Garden, G.A., Möller, T. (2006): Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1: 127-137
- (54) Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., Banik, N.L. (2012): Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 87 (1): 10-20
- (55) Ferrari, C.C., Tarelli, R. (2011): Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Dis.* 436813
- (56) Teismann, P. (2012): COX-2 in the neurodegenerative process of parkinson's disease. *Biofactors.* 38 (6): 395-397
- (57) Martins, T.B., Rose, J.W., Jaskowski, T.D., Wilson, A.R., Husebye, D., Seraj, H.S., Hill, H.R. (2011): Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am J Clin Pathol.* 136 (5): 696-704
- (58) Rose, J.W., Hill, K.E., Watt, H.E., Carlson, N.G. (2004): Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol.* 149 (1-2): 40-9
- (59) Wang, W.-Y., Tan, M.-S., Yu, J.-T., Tan, L. (2015): Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in alzheimer's disease. *Ann Transl Med.* 3 (10): 136

- (60) Chantong, B., Kratschmar, D.V., Nashev, L.G., Balazs, Z., Odermatt, A. (2012): Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation*. 28 (9): 260
- (61) Toda, N., Nakanishi, S., Tanabe, S. (2013): Aldosterone affects blood flow and vascular tone regulated by endothelium-derived NO: therapeutic implications. *Br J Pharmacol*. 168 (3): 519-533
- (62) Gravez, B., Tarjus, A., Pelloux, V., Ouvrard-Pascaud, A., Delcayre, C., Samuel, J., Clément, K., Farman, N., Jaisser, F., Messaoudi, S. (2015): Aldosterone promotes cardiac endothelial cell proliferation in vivo. *J Am Heart Assoc*. 4 (1)
- (63) Deliyanti, D., Miller, A.G., Tan, G., Binger, K.J., Samson, A.L., Wilkinson-Berka, J.L. (2012): Neovascularization is attenuated with aldosterone synthase inhibition in rats with retinopathy. *Hypertension*. 59 (3): 607-613
- (64) Klettner, A., Hamann, T., Schlüter, K., Lucius, R., Roider, J. (2014): Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. *Acta Ophthalmol*. 92 (8)
- (65) Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G.J., Nilsen, T.W. (2010): Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. 6
- (66) Kim, J.-H., Jin, H.-O., Park, J.-A., Chang, Y.H., Hong, Y.J., Lee, J.K. (2014): Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *Springerplus*. 3: 76

Publikationen

Bast, B.O., Rickert, U., Schneppenheim, J., et al., (2018): Aldosterone exerts anti-inflammatory effects on LPS stimulated microglia. Heliyon, 4: 10

Bast, B.O., (2015): Anti-inflammatory effects of aldosterone on microglia in relation to neurodegenerative diseases. 110th Annual Meeting Würzburg 2015/31. Arbeitstagung, Posterpräsentation, DOI 10.337/anatges.2015.00224

Bast, B.O., Winkler, M., Kurz, B., (2016): Reversed palmaris profundus muscle variation. Int J Anat Var (IJAV), 9: 21-24

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ralph Lucius, welcher mit mir das Thema und die Fragestellung erarbeitete, meine Begeisterung für Mikroglia weckte, mir bei komplizierten Fragestellungen immer als Ansprechpartner zur Seite stand und mir sein Vertrauen für die Durchführung und Abfassung dieser Arbeit schenkte.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Uta Rickert, die mich während der gesamten Zeit betreute, mich bei der Versuchsplanung, Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Arbeit immer wieder unterstützte und mich immer wieder motivierte. Ohne sie hätte ich es nicht geschafft die Arbeit vor meiner Approbation fertigzustellen.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlichst bei Monika Grell, Gaby Steinkamp und Inez Götting für ihre großartige, freundliche und technische Unterstützung im Labor.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bodo Kurz, mit dem ich bereits vor der Erstellung dieser Arbeit an einer Publikation zu einem anderen Thema arbeiten durfte. Aus diesem Mentoring konnte ich erlernen, wie man eine wissenschaftliche Arbeit verfasst.

Der größte und nicht in Worten festzuhaltende Dank gilt jedoch meinen Eltern Werner und Andrea Bast, die mir mein Leben lang als Eltern, Freunde und Mentoren zur Seite stehen und immer den Rücken stärken, mich bedingungslos in meinem Leben unterstützen und fördern. Ohne sie stünde ich heute nicht an diesem Punkt im Leben. Somit widme ich diese Arbeit in tiefster Dankbarkeit vor allem meinen Eltern. Aber auch meinen Großeltern die mich ebenfalls mein Leben lang gefördert und unterstützt haben.

Besonders hervorheben möchte ich dabei noch meinen Großvater Johannes Göttlich und meine Mutter Andrea Bast, denen es durch äußere Umstände, trotz des starken Wunsches, nicht möglich war Medizin zu studieren.

Mein abschließender Dank gilt meiner Verlobten Dr. Annika Boels, die mir jederzeit sowohl moralisch, als auch bei der Korrektur dieser Arbeit zur Seite stand.

Kiel, im Februar 2018

Björn-Ole Bast

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den 08.03.2018

Björn-Ole Bast